

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Departamento de Biología Molecular

**COMPLEJOS INTRACELULARES FORMADOS POR  
LA RNA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE:  
OLIGOMERIZACIÓN, FACTORES ASOCIADOS Y  
COMPLEMENTACIÓN GÉNICA**

TESIS DOCTORAL

**NÚRIA JORBA GRIFOLS**  
Mayo, 2009





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Departamento de Biología Molecular

**COMPLEJOS INTRACELULARES FORMADOS POR  
LA RNA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE:  
OLIGOMERIZACIÓN, FACTORES ASOCIADOS Y  
COMPLEMENTACIÓN GÉNICA**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por  
Núria Jorba Grifols  
para optar al título de Doctor  
Madrid, Mayo 2009



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección del Dr. Juan Ortín Montón.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de Formación de Personal Univesitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia



**A mis padres**



## AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que hayan pasado 6 años desde que llamé al laboratorio de Juan... me acuerdo perfectamente. Pregunté por el Dr. Ortín y la respuesta fue: *al aparato...*

Juan, muchas gracias por infinidad de cosas. No se por dónde empezar y tampoco sabría por dónde terminar... Gracias por aceptarme en el 116, que es mucho más que un laboratorio de gripe, por enseñarme tantas y tantas cosas, por la infinita paciencia..., por dejar la puerta del despacho SIEMPRE abierta, por cerrarla cuando hay que hablar de temas profesionales y personales, por el apoyo constante durante todos estos años. No me quiero olvidar tampoco de las largas horas de discusión de experimentos en el despacho, de las lecciones del fago Q $\beta$  y de la actividad específica... y a más a más intentar mejorar mi castellano... Jefe, me llevo una gran lección científica y personal del 116. GRACIAS!

Amelia, cuando llegué, de lo primero que me hablaste fue del buen ambiente en el laboratorio... y ya luego habamos de gripe. Cuanta razón tenías! Trabajar con vosotros ha sido fácil, divertido, estimulante y enriquecedor! Gracias por tu humildad, sinceridad y profesionalidad. Gracias por llevarnos a países lejanos con tus historias y por las largas charlas durante la comida. *En definitiva* (como tú siempre dices), gracias.

Cuántas horas compartidas con mis compañeros del labo. Sin vosotros esto no hubiera sido posible, así que gracias por el trabajo y por los buenos momentos durante todos estos años!

Yolanda, al igual que todos los que han pasado por el 116, sigo pensando que eres la chica 10! Gracias por la imprescindible ayuda de cada día, ese trabajo de fondo y sin pausa que hace posible que todos podamos investigar. Urtzi, que te voy a contar... sólo te puedo decir: GRACIAS! Gracias porque contigo aprendí un montón, gracias por tu amistad, gracias por esas largas charlas en las que arreglábamos el mundo a altas horas de la noche en Barriopi, por ser un ejemplo de trabajo impecable y por estar **siempre** a mi lado. Alex, mi compañero de viaje al CISA! Que divertido fue!! Gracias por ese desparpajo, por ser tan buen amigo y por estar tan loco!! Estelinya... gracias por tu genialidad! Estás como una cabra, pero te seguimos queriendo un montón!! Cuando llegué al laboratorio tuve la suerte de que Pablo estaba ahí.. dispuesto a todo, cargado de paciencia y buen humor para enseñarme los secretos de la gripe! Gracias profe! Gracias por todas las lecciones de ciencia y de no ciencia... ya sabes.. porque las tripas lo piden... Sandra era mi otra profe. Gracias por presentarme el mundo de las levaduras! El primer sitio que tuve en el labo... mejor no lo describo... Si hubiera buscado, fácilmente hubiera encontrado en algún estrato alguna reliquia de la humanidad. Para los que no lo sepáis... era el sitio de Eva. Gracias por todo Eva, por tu generosidad, por tu cariño y por los ánimos en los momentos en los que uno cree que imposible que algo salga bien. Quiero agradecer a todos los que ya no estáis en el labo: Ana, todo un ejemplo de trabajo maratoniano y representante del pico de las 6; Patri, el nervio andante del labo y nuestra comentarista de sucesos paranormales; María, compañera de los interminables días de biblioteca y de alguna que otra cervecita; Maite, Íñigo e Idoia, a vosotros también gracias por vuestros consejos científicos al comienzo de la tesis.

Alicia, gracias por tu disponibilidad absoluta y por tus ganas de ayudar! Por hacernos disfrutar a la hora de la comida con tus historias y por estar siempre pendiente de todos! Ariel, el argentino atípico!! virólogo donde los haya! Gracias por tus consejos y por tu buena ciencia. Tom, el alemán que nunca se estresa! El *clonador* oficial de plásmidos del labo! Y más tarde fueron llegando al laboratorio nuevos compañeros que me han acompañado hasta el final de la tesis. Susana, gracias por tu sinceridad y por tu empeño en que me acuerde de las cosas! Gracias por los buenos momentos y por recordarme cada día dónde tengo la cabeza!! Rocío, mi compañera de poyata!!! Al final se me pegó tu orden!! Trabajar contigo codo con codo ha sido genial, y sobretodo divertido! Cuánto les debemos a las bacterias... Por poquito tiempo compañero de poyata... Emilio. Gracias por transmitir tu buen humor! Gracias por las innumerables risas y por tu genial excentricidad!!! Patricia, la catalano-burgalesa del labo!! Gracias por alegrarnos cada primavera con tus chocolates y por tu buen humor! Merche! siempre contenta! Inquieta y encantadora sevillana!. Noe, nuestra madrileña ejemplar! Gracias por ayudarnos día a día con tu trabajo, por hacer que

todo sea fácil y por tus clases de garbanzos... Y llegó Maite, que nos ha dejado el labo *RNAse-free*! Gracias por todos los buenos ratitos y por enseñarnos cómo mimar a los virus!! Roberto, gracias por enseñarnos las maravillas de Burgo de Osma. Ánimo con esa tesis!!! Y entonces llegó Peter,... o comino.. o chariniiii. Sara, mil gracias por todo! Contigo he aprendido muchísimo! Intentar enseñarte ha sido una gran experiencia porque has hecho que sea agradable, divertido, motivante y enriquecedor! **Gracias** por ser tan buena en todo y con todos! Y Joan, el hombre de la casa. Ánimo con las chicas!... y cuidado con las hormonas! Marcela, que también nos ayuda en el labo, gracias! Y las últimas incorporaciones: Lorena, ánimo con NXP2 y gracias por ser tan cariñosa!! Y Paloma, suerte con esa tesis que has empezado!

Quiero agradecer al personal del CNB, que cada día están ahí para ayudarnos. En especial, a la gente de informática... que creo que tiemblan cada vez que me ven. A Sylvia, por tu paciencia en el confocal y por no cansarte nunca de enseñarnos! A Silvia, por los innumerables intentos de proteómina con los factores celulares! Al final pudimos con ellos! A Socorro, gracias por tu cálido saludo cada mañana! A Instrumentación... por arreglar las pipetas, fuentes y cubetas en tiempo récord!! Y como no.. a Fernando de recepción... por salvarme el pellejo alguna que otra vez! Y quiero agradecer al resto de gente, Jacinta, Carlos, Pepa, etc... por toda la labor que realizan día tras día. El resto de compañeros del Departamento que alegran nuestro largo camino en busca de hielo, en las largas horas de cultivos y en las escaleras del CNB.

Científicamente quiero agradecer a Alfredo por hacerme creer en el silenciamiento... y eso que era tarea difícil... También quiero agradecer a José Antonio Melero y a Lorena Ver por la generación del anticuerpo de DDX3.

Jordi y Lluís... dos científicos locos, compañeros de tesis y cervezas desde Barcelona. Jordi, gracias por tus consejos, por tu buen hacer y por ser tan buen amigo. Las planarias y los virus nos han llevado hasta DDX3!! Casualidades de la vida! Y Lluís... el más loco de todos! *Fes-me un favor!!! Roba-li al Sam el samguayoflife!* Gracias por estar siempre dispuestos a compartir un ratito con nosotros! A Sergio le debemos mucho, gracias por los buenísimos momentos que compartimos juntos! A Oscar, un genio ahí donde lo véis... y ex-compañero de piso! *Gràcies per tantes estones a 3C i pels bons consells de doctor!* Toni, Leo, Néstor, Ale, Javi i Marcos, *gràcies per les hores compartides a Biologia!!*

Carles, Cris i Pat, *gràcies per estar sempre a "Arenys" i per trobar temps allà on sembla impossible!* Oriol i Arnau, *always missing (ara un menys que l'altre...)... perquè sempre és com si no haguessis passat el temps!*

Laia, Clara, Laura, Montse y Laiona, gracias por estar siempre a mi lado, por animarme desde Barcelona, por vuestra incondicional amistad, por vuestras visitas a los madriles y por infinidad de cosas que no me caben en esta tesis. Sin vuestro apoyo no hubiera sido lo mismo! GRACIAS! A los tres mosqueteros... *gràcies per la vostra ajuda!*

A mi familia de Girona! Gracias por animarnos y por cuidarnos tanto! Pau i Mònica! *moltes gràcies per estar sempre amb nosaltres.*

A toda mi familia. A mi abuelo Víctor, un referente para mí en muchos sentidos. *Gràcies per ensenyarme tanta ciència i per intentar que entengui tantes i tantes coses! On hauran anat a parar els teus gens...* A mi abuela Núria. *Àvia, moltes gràcies per estar sempre al meu costat, pel farcellet, per la companyia i pel carinyo. Ara ja sí... ja quasi he acabat!!!!*

A mis hermanas Elena y Berta, dos locas increíbles!! *Gràcies per tot, per ser com sou i per cuidar-me tant!*

A mis padres les debo tanto.... gracias por el apoyo incondicional, por los ánimos, por enseñarme y por guiarme. Por alegraros conmigo de los buenos resultados y por preguntar y por estar al pie del cañón en todo momento. Por ser como sois. Por creer en lo que hago. SIEMPRE. GRACIAS!!

A Sam. Compañero de carrera, de tesis, de viaje... Gracias por estar a mi lado en todo momento. Gracias por tantas y tantas cosas... Entre ellas recordarme cada día cuál es mi derecha y quién es el marido de la vaca. A por otra... y a por muchas más!

**GRÀCIES!!**







# ÍNDICE





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	23
<i>SUMMARY</i> .....	31
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	35
<b>1. Historia</b> .....	37
<b>2. Clasificación y nomenclatura</b> .....	37
<b>3. La partícula viral</b> .....	37
3.1 Proteínas virales.....	38
3.2 Genoma y RNAs virales presentes en la célula infectada.....	40
<b>4. La ribonucleoproteína viral</b> .....	42
4.1 La polimerasa viral.....	42
4.1.1 Subunidad PB1.....	43
4.1.2 Subunidad PB2.....	43
4.1.3 Subunidad PA.....	45
4.1.4 Estructura y ensamblaje de la polimerasa viral.....	46
4.2 El promotor viral.....	47
4.3 La nucleoproteína.....	47
4.4 Estructura de la RNP.....	48
<b>5. El ciclo de infección del virus de la gripe</b> .....	48
5.1 Adsorción y entrada de las partículas virales.....	48
5.2 Replicación, transcripción y expresión génica.....	49
5.3 Morfogénesis viral.....	50
<b>6. Procesos de replicación y transcripción virales</b> .....	51
6.1 Transcripción viral.....	52
6.2 Replicación viral.....	54
6.3 Regulación de los procesos de replicación y transcripción virales.....	55

<b>7. Interacción virus-hospedador. Factores celulares implicados en el ciclo de infección.....</b>	<b>57</b>
7.1 Interacción virus-hospedador.....	57
7.2 Factores celulares implicados en la replicación del virus de la gripe .....	58
7.2.1 <i>Proteínas implicadas en la compartimentalización de la síntesis del RNA viral</i> .....	58
7.2.2 <i>Proteínas implicadas en la síntesis replicativa y en la transcripción viral</i> .....	59
7.2.3 <i>Proteínas implicadas en la inhibición de la transcripción y maduración de mRNAs celulares</i> .....	60
7.2.4 <i>Proteínas implicadas en el splicing celular</i> .....	60
7.2.5 <i>Proteínas implicadas en la traducción viral</i> .....	60
7.2.6 <i>Proteínas implicadas en el transporte de componentes virales</i> .....	60
7.2.7 <i>Proteínas implicadas en otras funciones</i> .....	61
7.2.8 <i>Proteínas celulares presentes en el virión</i> .....	61
<b>8. Formación de complejos de replicación en virus RNA. Fenómenos de oligomerización y complementación intragénica.....</b>	<b>62</b>
8.1 Virus con genoma RNA de polaridad positiva.....	62
8.2 Virus con genoma RNA de polaridad negativa.....	63
<b>9. Patogénesis de la infección por el virus de la gripe. Virus humanos y aviares.....</b>	<b>63</b>
 <b>OBJETIVOS.....</b>	 <b>69</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	 <b>73</b>
<b>MATERIALES:</b>	
1. Líneas celulares eucariotas.....	75
2. Estirpes bacterianas.....	75
3. Virus.....	75
4. Plásmidos.....	75
5. Anticuerpos.....	76

## MÉTODOS:

<b>1. Manipulación de DNA y clonajes.....</b>	<b>77</b>
1.1 Clonaje de los plásmidos pCMVPB2HIS-R142A, pCMVPB2HIS-F130A.....	77
1.2 Clonaje de los plásmidos pCMVPB2-E361A, pCMVPB2-H361A, pCMVPB2-K376A, pCMVPB3-F404A.....	77
1.3 Clonaje del plásmido pCDNAHAst-NXP2.....	77
1.3.1 Clonaje del plásmido <i>pCDNAHA-stuffer</i> .....	77
1.3.2 Obtención del cDNA del gen <i>NXP2</i> .....	78
1.3.3 Clonaje del plásmido <i>pGEM-NXP2</i> .....	78
1.3.4 Clonaje del plásmido <i>pCDNAHAst-NXP2</i> .....	78
1.4 Clonaje de los plásmidos pSRPURO-stuffer, pSRPURO-DDX3, pSRPURO-Tm.....	78
1.4.1 Clonaje del plásmido <i>pSRPURO-stuffer</i> .....	78
1.4.2 Clonaje del plásmido <i>pSRPURO-DDX3</i> .....	78
<b>2. Manipulación de RNA.....</b>	<b>79</b>
2.1 Aislamiento de RNA de RNPs purificadas.....	79
2.2 Hibridación <i>dot-blot</i> .....	79
2.3 Obtención de ribosondas para la detección de RNA.....	79
2.3.1 Preparación del molde para la ribsonda del pseudo-genoma <i>viral clon23</i> .....	79
2.3.2 Transcripción <i>in vitro</i> de las ribosondas.....	80
2.3.3 Purificación y análisis de las ribosondas.....	80
<b>3. Manipulación de cultivos celulares.....</b>	<b>80</b>
3.1 Mantenimiento de cultivos celulares.....	80
3.2 Transfecciones.....	80
3.2.1 Fosfato cálcico.....	80
3.2.2 Infección con <i>vTF7-3</i> y transfección con fosfato cálcico.....	81
3.2.3 <i>Lipofectamina 2000</i> .....	81
<b>4. Silenciamiento génico.....</b>	<b>81</b>
4.1 Silenciamiento mediante el plásmido pSRPURO.....	81
4.2 Silenciamiento mediante siRNA.....	81

<b>5. Técnicas virológicas.....</b>	<b>83</b>
5.1 Infecciones.....	83
5.2 Generación de <i>stocks</i> de virus.....	83
5.3 Titulación de virus mediante ensayo en placa.....	83
5.4 Curvas de crecimiento.....	83
<b>6. Análisis de proteínas.....</b>	<b>84</b>
6.1 Marcaje metabólico <i>in vivo</i> de proteínas virales.....	84
6.2 Deglicosilación de proteínas en extractos celulares.....	84
6.3 Inmunofluorescencia.....	84
6.4 Western Blot.....	84
6.5 Tinción de geles de acrilamida.....	85
6.5.1 Tinción de plata.....	85
6.5.2 Tinción con PageBlue.....	85
<b>7. Expresión y purificación de complejos de polimerasa viral recombinantes.....</b>	<b>85</b>
7.1 Expresión de complejos de polimerasa TAP.....	85
7.2 Purificación de complejos de polimerasa TAP.....	86
7.2.1 Obtención de los extractos celulares. ....	86
7.2.2 Purificación de la polimerasa viral recombinante TAP.....	86
7.3 Cromatografía de exclusión molecular.....	87
<b>8. Reconstitución y purificación de RNPs.....</b>	<b>87</b>
8.1 Reconstitución de RNPs <i>in vivo</i> .....	87
8.2 Purificación de RNPs mediante cromatografía de afinidad con la etiqueta de poli-histidinas.....	87
<b>9. Análisis de la actividad de las RNPs.....</b>	<b>88</b>
9.1 Transcripción <i>in vitro</i> .....	88
9.2 Determinación de proteína CAT.....	88
<b>10. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....</b>	<b>89</b>
10.1 MALDI-TOF.....	89
10.2 MS-MS.....	89



<b>RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
<b>1. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE CON FACTORES CELULARES HUMANOS .....</b>	<b>93</b>
<b>1.1 Identificación de factores celulares asociados a la RNA polimerasa viral.....</b>	<b>93</b>
1.1.1 Expresión y purificación de los complejos de la polimerasa viral recombinantes.....	93
1.1.2 Identificación de factores celulares asociados a la polimerasa viral.....	97
<b>1.2 Análisis funcional de los factores celulares asociados a la polimerasa durante la infección viral.....</b>	<b>100</b>
1.2.1 Análisis de los factores asociados a la polimerasa viral en células infectadas...	100
1.2.2 Silenciamiento génico de los factores celulares asociados al complejo viral.....	103
1.2.3 Análisis de la infección viral en células que carecían de distintos factores celulares .....	104
1.2.3.1 Estudio del crecimiento del virus.....	105
1.2.3.2 Estudio de la acumulación de proteínas virales .....	105
1.2.3.3 Estudio de la síntesis de proteínas virales.....	106
1.2.3.4 Estudio de la localización subcelular de la proteína viral NP durante la infección en células con la proteína SFPQ silenciada.....	106
1.2.3.5 Estudio de la acumulación de proteínas virales en células que sobreexpresan los factores HA-NXP2 y DDX3-HA.....	108
<b>1.3 Identificación de factores celulares asociados a la subunidad PB2 de la polimerasa viral.....</b>	<b>110</b>
1.3.1 Expresión y purificación de la subunidad PB2 recombinante.....	110
1.3.2 Identificación de factores asociados a la proteína PB2.....	110
1.3.3 Análisis de la interacción de las distintas isoformas de importina $\alpha$ con la subunidad PB2 de virus humanos y aviares.....	111
<b>2. ANÁLISIS DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE <i>in vivo</i>.....</b>	<b>114</b>
<b>2.1 Caracterización del tamaño de los complejos de polimerasa viral purificados.....</b>	<b>114</b>

<b>2.2 Análisis de los complejos oligoméricos de la polimerasa viral.....</b>	<b>115</b>
2.2.1 Estudio de la interacción entre complejos de polimerasa viral.....	115
2.2.2 Estudio de la interacción entre las distintas subunidades de la polimerasa viral.....	117
<b>3. ANÁLISIS GENÉTICO DEL PROCESO DE REPLICACIÓN VIRAL .....</b>	<b>118</b>
<b>3.1 Diseño experimental .....</b>	<b>118</b>
<b>3.2 Complementación de polimerasas durante los procesos de replicación viral:     ¿es posible rescatar por complementación en <i>trans</i> una polimerasa deficiente     en replicación ? .....</b>	<b>118</b>
<b>3.3 ¿Es la polimerasa residente en la RNP responsable de la síntesis del RNA viral progenie? .....</b>	<b>123</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
FACTORES CELULARES IMPLICADOS EL CICLO INFECTIVO DEL VIRUS DE LA GRIPE	
<b>1. Identificación de factores celulares asociados a la polimerasa viral.....</b>	<b>131</b>
<b>2. Estrecha relación entre la expresión génica viral y celular.....</b>	<b>132</b>
2.1 ¿Dónde ocurre la síntesis de RNA viral? ¿Tiene lugar en asociación con la RNAPII celular? .....	133
2.2 <i>Splicing</i> y exportación de los mRNAs virales. ¿Cómo se exportan del núcleo los mRNAs virales que no son procesados por la maquinaria celular de <i>splicing</i> ? .....	135
2.3 Traducción celular <i>versus</i> traducción viral.....	139
<b>3. DDX3 podría estar implicada en la evasión de la respuesta inmune primaria.....</b>	<b>140</b>
<b>4. ¿Pueden ser las interacciones entre proteínas virales y celulares una nueva diana terapéutica? .....</b>	<b>141</b>
<b>5. Importinas: nuevos determinantes de rango de hospedador.....</b>	<b>142</b>

## NUEVO MODELO DE LOS PROCESOS DE REPLICACIÓN VIRAL

<b>6. Oligomerización de la polimerasa viral <i>in vivo</i></b> .....	143
<b>7. Complementación en <i>trans</i> entre polimerasas durante la replicación viral</b> .....	144
7.1 ¿Puede una polimerasa complementar a otra defectiva en replicación? .....	145
7.2 Una polimerasa distinta a la que sintetiza el RNA encapsida el RNA de nueva síntesis.....	145
7.3 Una polimerasa distinta a la residente en la RNP es responsable de la síntesis viral.....	146
<b>8. Nuevo modelo de replicación viral</b> .....	146
<b>9. El modelo de replicación en <i>trans</i> en el contexto de la infección viral</b> .....	148
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	153
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	157
 <b>ANEXO 1: Material suplementario:</b> .....	185
1.1 Factores celulares asociados a la polimerasa viral .....	186
1.2 La gripe española.....	192
 <b>Anexo 2: Publicaciones</b> .....	195



# ABREVIATURAS





**ANT3:** adenine nucleotide translocator

**AraC:** Citosina-β-D-arabinofuranósido (Cytosine arabinoside)

**AREs:** Elementos ricos en A y U (AU-rich RNA elements)

**BiFC:** Biomolecular Fluorescence Complementation

**BL-D:** azul dextrano (blue dextran)

**BMV:** Virus del mosaico del bromo (Brome mosaic virus)

**BSA:** Seroalbúmina bovina (Bovine serum albumin)

**CAT:** cloramfenicol acetiltransferasa

**CBD:** dominio de unión a calmodulina (calmodulin binding domain)

**CHD6:** Chromodomain helicase DNA binding protein 6

**Ci:** Curio

**CMV:** promotor de Citomegalovirus

**CoAA:** Coactivator activator

**CPSF:** Factor de especificidad del corte y la poliadenilación (Cleavage and polyadenylation specificity factor)

**CRM1:** Chromosome maintenance region 1 protein

**cRNA:** RNA viral de polaridad positiva.

**cRNP:** RNP que encapsida una molécula de cRNA

**CRs:** Complejos de Replicación

**CSN1:** Casein αS1

**C-t:** Extremo carboxilo terminal

**CT:** catálasa

**CTD:** Dominio C-terminal de la RNAPII celular (Carboxy-terminal domain of RNAPII)

**CTRL:** control

**DDX3:** DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked, ATP-dependent RNA helicase DDX3X, DBX, DDX14, HLP2

**DDX5:** DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5, HLR1, ATP-dependent RNA helicase DDX5, RNA helicase p68

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**dsRNA:** RNA de doble cadena (double stranded RNA)

**DTT:** Ditiotreitol

**Ebp1:** ErbB3-binding protein 1

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético (Ethylendiaminetetetraacetic acid)

**EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético (Ethylenglycoltetraacetic acid)

**eIF4G:** Factor de iniciación eucariota 4G (Ekaryotic initiation factor 4G)

**ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

**FBS:** suero fetal bobino (fetal bovine serum)

**FR:** ferritina

**GAPDH:** gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**Glu:** glutámico

**GRSF-1:** *G-Rich RNA sequence binding factor 1*

**HA:** Hemaglutinina

**HBV:** Virus de la Hepatitis B

**hCLE:** Proteína CLE humana

**HCV:** Virus de la Hepatitis C

**HDV:** Virus de la Hepatitis D

**His:** Histidina

**hnRNP M1-4:** *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*

**HSC70:** *Heat shock cognate 70 kDa protein*

**Hsp90:** Proteína de choque térmico 90 (*Heat shock protein 90*)

**hStaufen:** Proteína Staufén humana

**IFN:** Interferón

**IgG:** Inmunoglobulina G

**importina  $\alpha$ 1:** KPNA2

**importina  $\alpha$ 5:** KPNA1

**importina  $\alpha$ 7:** KPNA6

**INS:** Elemento de inestabilidad (*Instability Elements of HIV-1*)

**kDa:** kilo-Dalton

**La:** autoantígenos La

**LMB:** Leptomicina B

**log:** logaritmo en base 10

**Lys:** lisina

**M1:** Proteína de matriz 1

**M2:** Proteína de matriz 2

**MALDI-TOF:** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*

**MDa:** mega-Dalton

**MDCK:** Células de riñón de perro Madin Darby (*Madin Darby canine kidney cell*)

**miRNA:** micro RNA

**MM:** masa molar

**MPO:** Mieloperoxidasa

**mRNA:** RNA mensajero viral (*messenger RNA*)

**MS-MS:** espectrometría de masas en tándem

**Mx:** *myxovirus (influenza virus) resistance 1*

**NA:** Neuraminidasa

**NEP:** Proteína de exportación nuclear del virus de la gripe (NS2)

**NES:** Señal de exportación nuclear (*Nuclear export signal*)

**Ni-NTA:** *Nickel-nitrilotriacetic acid*



**NLS:** Señal de localización nuclear (*Nuclear localisation signal*)

**NP:** nucleoproteína

**NS1:** Proteína no estructural del virus de la gripe

**NS1-BP:** *NS1 binding protein*

**N-t:** Extremo amino terminal

**nt:** Nucleótido

**NV:** Norovirus

**NXP2:** MORC family CW-type zinc finger 3 (MORC3)

**MCM2:** *Minichromosome maintenance complex component 2*

**PA:** Proteína ácida del virus de la gripe

**PAC:** Puromicina acetil transferasa

**PB1:** Proteína básica 1 del virus de la gripe

**PB2:** Proteína básica 2 del virus de la gripe

**PB2-256:** Proteína que contiene los primeros 256 aminoácidos de PB2

**PABP1:** Proteína de unión a colas de poliA I (*Poly-(A) binding protein I*)

**PABPII:** Proteína de unión a colas de poliA II (*Poly-(A) binding protein II*)

**PBS:** tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)

**PBSc:** PBS completo

**PML (ND10):** *Promyelocytic leukemia (Nuclear Dot 10)*

**RAF 1-2:** *RNA activation factor 1-2*

**RanBP5:** *RAN binding protein 5, importin  $\beta$ 3*

**RdRp:** RNA polimerasa RNA dependiente (*RNA dependent RNA polymerase*)

**RNA:** Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

**RNAPII:** *RNA polimerasa II*

**RNP:** ribonucleoproteína

**rRNA:** RNA ribosomal

**rpm:** revoluciones por minuto

**SC-35:** *Splicing component, 35 kDa*

**SDS:** dodecilsulfato sódico (*sodium dodecylsulphate*)

**SFPQ (PSF):** *Splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)*

**siRNA:** *small interference RNA*

**SV:** Sendai Virus

**TA:** temperatura ambiente

**TAP:** Purificación de afinidad en dos pasos (*Tandem Affinity Chromatography*)

**Tat-SF1:** *HIV-1 Tat specific factor 1*

**TEV:** Virus del mosaico del Tabaco (*Tobacco etch virus*)

**ts:** termosensible

**TR:** tiroglobulina

**UAP56:** 56 kDaU2AF65-associated protein (BAT1/NPI5)

**UFP:** unidades formadoras de placa

**U6 snRNA:** RNA nuclear pequeño U6 (small nuclear RNA U6)

**UTR:** Región no traducida (Unstranslated region)

**VDAC1:** voltage-dependent anion channel 1

**Vic:** cepa Victoria del virus de la gripe

**vRNA:** RNA viral genómico de polaridad negativa

**vRNP:** RNP que encapsida una molécula de vRNA

**vTF7-3:** Virus vaccinia que expresa la polimerasa del fago T7

**WB:** Western blot





# SUMMARY





The influenza virus polymerase complex is a heterotrimer formed by the PB1, PB2 and PA subunits and is required for virus transcription and replication in the nucleus of infected cells. In this Doctoral Thesis we present the characterization of the complexes formed intracellularly by the influenza polymerase in human cells. The three subunits of the polymerase were co-expressed in human cells and the intracellular complexes were purified by the TAP approach, which involves IgG-Sepharose and calmodulin-agarose chromatography, under very mild conditions. The purified complexes contained the heterotrimeric polymerase and a series of associated proteins. Among them, NXP2, DDX5, DDX3, hnRNPM, hnRNPH1, SFPQ, S3, CoAA and  $\beta$ -tubulin were identified by MALDI-MS. None of the proteins identified showed altered expression level or altered intracellular localisation in influenza virus-infected cells. However, DDX5, hnRNPM, NXP2 and SFPQ co localised with viral RNPs in the nucleus at early times of infection, while DDX3 co-localised with RNPs in the cytosol at later times in the infection. DDX5, hnRNPM and DDX3 were not essential proteins for the influenza virus cycle, but the absence of SFPQ severely affected the yield of viral infection.

As PB2 is a relevant host-range determinant we expressed a TAP-tagged PB2 in human cells and isolated intracellular complexes. Alpha-importin was identified as a PB2-associated factor by proteomic analyses. To ascertain whether PB2- $\alpha$ -importin binding could contribute to the adaptation of H5N1 avian viruses to man, their association in vivo was determined. Human  $\alpha$ -importin isoforms associated efficiently to PB2 protein of an H3N2 human virus but bound to diminished and variable extents to PB2 from H5N1 avian

or human strains. This result suggests that the function of  $\alpha$ -importin during RNA replication may play a critical role in the adaptation of avian viruses to the human host.

The purified intracellular complexes of recombinant polymerase mentioned previously were analysed further. Gel-filtration analysis indicated that, although most of the purified polymerase behaved as a heterotrimer, a significant proportion of the purified material migrated as polymerase dimers, trimers and higher oligomers. Co-purification of polymerase complexes alternatively tagged in the same subunit confirmed that the polymerase complex might form oligomers intracellularly. RNA polymerases of other viruses are able to oligomerise and synthesise cooperatively viral RNA. To analyse the possible relevance of influenza RNA polymerase oligomerisation we studied the mechanisms of the viral RNA replication. We used efficient systems for recombinant RNP transcription/replication in vivo and well defined polymerase mutants deficient in either RNA replication or transcription to address the roles of the polymerase complex present in the template RNP and newly synthesised polymerase complexes during replication. The results of trans-complementation experiments showed that soluble polymerase complexes can synthesise progeny RNA in trans and become incorporated into progeny vRNPs. These results are compatible with a new model for virus RNA replication, whereby a template RNP would be replicated in trans by a soluble polymerase complex and a polymerase complex distinct from the replicative enzyme would direct the encapsidation of progeny vRNA.





# INTRODUCCIÓN



## 1. HISTORIA

Los virus de la gripe son agentes patógenos altamente variables y ocasionan en el hombre infecciones respiratorias en forma de epidemias anuales y pandemias ocasionales. Estas propiedades han permitido definir la gripe como una enfermedad constante causada por un virus siempre cambiante. En su origen, estos virus derivan de agentes que están en equilibrio evolutivo en otras especies, principalmente aves silvestres, en las que replican eficazmente pero a las que no causan enfermedad. Ocasionalmente, estos virus enzoonóticos en aves son transmitidos a la población humana dando lugar a pandemias de gran impacto. Estas características, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, han hecho de los virus de la gripe uno de los patógenos conocidos que más morbilidad y mortalidad han causado en la historia. La pandemia más letal conocida fue la denominada gripe española (virus A, subtipo H1N1) que duró desde 1918 a 1919. Se estima que entre 20 y 40 millones de personas murieron a causa del virus de la gripe, aunque la cifra de mortalidad es difícil de concretar debido a la coincidencia temporal con la Primera Guerra Mundial (Anexo 1.2). Esta gran mortalidad aceleró las investigaciones con el objetivo de identificar el agente causal de la enfermedad. Hubo que esperar hasta 1935 para que Wendell Stanley estableciera la verdadera naturaleza no bacteriana de los virus de la gripe.

La infección por gripe provoca síntomas severos entre los que se incluyen la fiebre alta (39-40°C), dolor de cabeza, postración y dolor muscular. Además, la infección por gripe puede ocasionar posteriores infecciones virales o bacterianas del tracto respiratorio inferior, provocando neumonía.

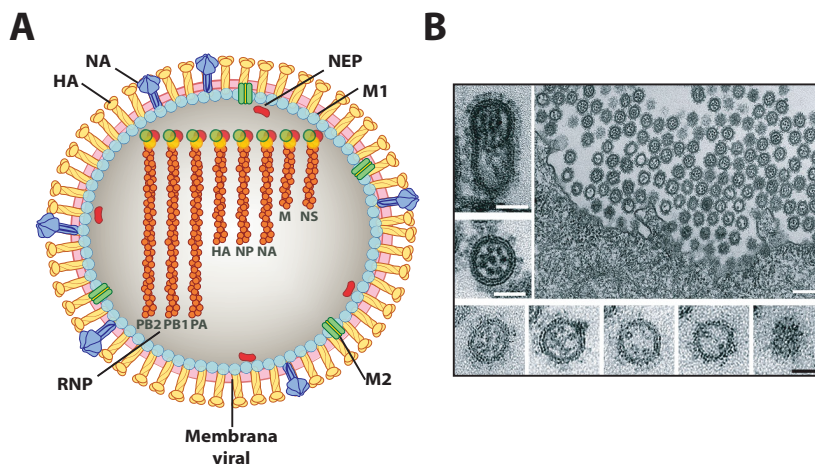
Todos estos hechos hacen que tanto el estudio a nivel molecular, como el control epidemiológico del virus de la gripe sigan siendo de gran importancia.

## 2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, familia que incluye virus con envuelta y un genoma segmentado, de cadena sencilla y polaridad negativa. Los virus de esta familia se clasifican dentro de los géneros: *Influenzavirus A*, que infecta humanos, algunos mamíferos y gran variedad de aves; *Influenzavirus B*, que infecta únicamente humanos; *Influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus*, que incluye las especies Dhori virus y Thogoto virus; e *Isavirus*, que infecta al salmón. Los virus tipo A se dividen en subtipos que se basan en la naturaleza antigénica de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Los virus clínicamente relevantes en humanos son los tipo A y B, siendo los del tipo A los únicos que han producido pandemias a lo largo del siglo XX. Por tanto, en esta memoria únicamente se hace referencia a cepas de virus tipo A ya que constituyen el principal modelo de estudio del laboratorio.

## 3. PARTÍCULA VIRAL

Las partículas virales son pleiomórficas y heterogéneas, aunque con tendencia a adquirir formas esféricas, ovaladas o filamentosas según la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne et al, 1960; Hoyle et al, 1961), y poseen una envuelta lipídica derivada de la membrana plasmática de las células infectadas (Compans & Chopin, 1975). Los viriones tienen un diámetro de entre



**Figura I1. El virus de la gripe.** (A) Representación gráfica de una partícula viral. Se muestran las dos glicoproteínas de membrana, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el canal iónico M2, la proteína matriz M1, la proteína NEP, las ocho RNPs y la membrana del virus derivada de la membrana celular. (B) Estructura del virión. La micrografía electrónica mayor corresponde a viriones saliendo de células MDCK a las 10 horas post-infección. Los puntos electrodensos en el interior del virión corresponden a las RNPs. Las micrografías electrónicas pequeñas corresponden a secciones seriadas de un virión donde se observan 7 RNPs alineadas en forma de anillo con una octava RNP central. El número de puntos disminuye progresivamente a medida que se incrementa la distancia al punto de *budding*, lo que está de acuerdo con la diferente longitud de las vRNPs. Imágenes de microscopía obtenidas de Noda et al. (Noda et al, 2006)

80 y 120 nm, aunque los filamentosos, que son los más frecuentemente observados en preparaciones clínicas, pueden llegar hasta los 300 nm. La morfología del virus también se caracteriza por presentar unas espículas en la membrana visibles al microscopio electrónico mediante tinción negativa que tienen una longitud de 10 a 14 nm. Estas espículas son las glicoproteínas de membrana hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La membrana también contiene la proteína M2 (Figura I1).

### 3.1 Proteínas virales

En la envuelta del virión se encuentran las glicoproteínas de membrana HA y NA (Figura I1-A). La proteína **HA** forma un homotrímero cuya estructura y función están muy conservadas en todos los virus a pesar de la evolución y variación de su secuencia. Las funciones más importantes de HA son el reconocimiento del receptor celular (el ácido siálico) y la fusión con la membrana celular

para permitir la entrada del virus (Weis et al, 1988). Gracias a un cambio conformacional de su estructura dependiente de pH se produce la fusión de la envuelta del virus y la membrana lisosomal para permitir la penetración del genoma viral en la célula infectada (Bullough et al, 1994). La proteína **NA** forma un homotetrámero con forma de bastón (Colman et al, 1983; Varghese et al, 1983). Esta proteína tiene actividad neuraminidasa y su función en el ciclo viral es la de eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular. De este modo se permite la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular y su propagación mediante la limpieza de este nuevo entorno (mucus y matriz extracelular). Sin embargo, NA también elimina los receptores celulares que contienen ácido siálico que quedan unidos a HA tras la liberación de los viriones (Palese & Compans, 1976; Palese et al, 1974). NA y HA son los dos determinantes antigénicos contra

los que se dirige la respuesta inmunológica humoral neutralizante. Dentro de los virus tipo A se han descrito 16 subtipos de HA y 9 de NA. La combinación de los distintos subtipos determina la gran variabilidad presente dentro de los virus tipo A (WHO, 1980), y afecta también el rango de hospedador, la patogenicidad y la virulencia de las distintas cepas, como se comentará más adelante (Nicholls et al, 2008; Yamada et al, 2006). En la envuelta del virión también se encuentra anclada la proteína **M2**, aunque en cantidades mucho menores (Zebedee & Lamb, 1988). La estructura de la forma biológicamente activa de la proteína es un tetrámero que forma un canal iónico (Bauer et al, 1999; Holsinger & Lamb, 1991; Pinto et al, 1992). La principal función del canal iónico durante la infección viral es la de conducir protones desde los endosomas acidificados hasta el interior del virus para dar lugar a la disociación del complejo de ribonucleoproteínas del resto de proteínas virales. M2 también está implicada en la alteración del ratio de partículas filamentosas y esféricas (Roberts et al, 1998) y en el ensamblaje y liberación de viriones (Hughey et al, 1995; Schroeder et al, 2005).

**M1** es la proteína más abundante del virión, se encuentra inmediatamente por debajo de la envuelta lipídica formando la matriz estructural de la partícula. Conecta los componentes del interior del virus con las proteínas de la envuelta (Nayak et al, 2004). La proteína M1 tiene la capacidad de formar homo-oligómeros y forma estructuras ordenadas con los residuos cargados positiva y negativamente en caras opuestas (Arzt et al, 2001; Harris et al, 2001). Una de sus superficies está fuertemente cargada positivamente (Sha & Luo, 1997) y es probablemente responsable de la unión al RNA (Ye et al, 1989; Ye et al, 1987), mientras que la superficie opuesta es hidrofóbica y sería responsable de la interacción con membranas. La proteína M1

interacciona con las RNPs y con la proteína NEP. Se ha propuesto que M1 tiene un papel clave en el ensamblaje de viriones ya que podría reclutar los componentes virales hasta el sitio de ensamblaje en la membrana plasmática. La proteína **NEP** (antes denominada NS2) es la menos abundante del virión e interacciona con el receptor de exportación nuclear CRM1 (Neumann et al, 2000) y con varias nucleoporinas (O'Neill et al, 1998). NEP interacciona también con M1, por lo que se propone que la exportación de las RNPs progenie del núcleo es gracias al complejo RNP-M1-NEP (Yasuda et al, 1993).

En el interior de la matriz estructural se encuentran las ribonucleoproteínas (**RNPs**). Estos complejos forman las unidades básicas funcionales que llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada. Las RNPs contienen el genoma del virus y están formadas por la polimerasa, constituida por tres subunidades (PB1, PB2 y PA), y la nucleoproteína (NP). Las RNPs y sus componentes se describen posteriormente.

Las proteínas NS1 y PB1-F2 son las únicas proteínas que se expresan durante la infección viral, cuya presencia en el virión aún no ha sido descrita. La proteína **NS1** está implicada en diferentes funciones que se resumen brevemente:

*a) Modulación del proceso de splicing:* Como se verá más adelante, los segmentos 7 y 8 del virus requieren *splicing* para su correcta expresión (Lamb et al, 1980; Lamb et al, 1981). NS1 inhibe el *splicing* de los mRNAs celulares, y como mínimo también el de su propio mRNA (Garaigorta & Ortin, 2007; Qiu et al, 1995); *b) Inhibición del procesamiento 3' de los pre-mRNAs:* NS1 impide la maduración de los mRNAs celulares inhibiendo el corte y poliadenilación de su extremo 3' (Chen et al, 1999). El procesamiento de los extremos 3' de los mRNAs virales no sufren esta inhibición ya

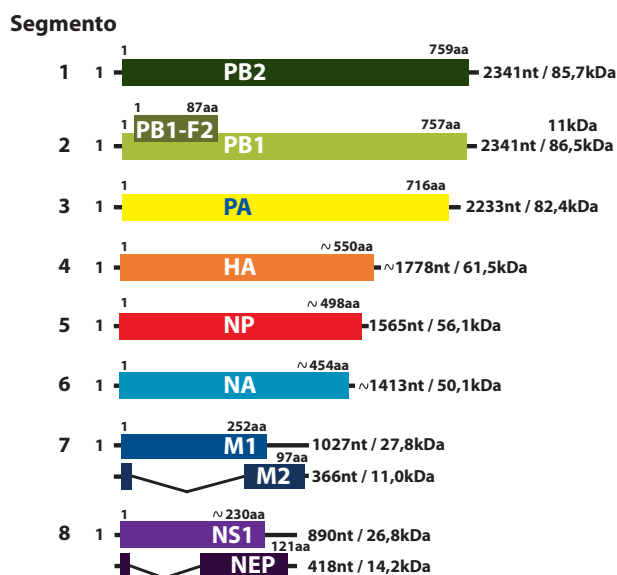
que el mecanismo es distinto de los celulares, como se verá más adelante (Poon et al, 1998; Poon et al, 1999); *c) Inhibición del transporte de mRNAs*: NS1 es responsable de la retención nuclear de mRNAs celulares poliadenilados que se transcriben bajo el control de la RNA polimerasa II (Fortes et al, 1994; Katze & Krug, 1984; Qian et al, 1994; Qiu & Krug, 1994), y forma un complejo de inhibición para la exportación nuclear (Satterly et al, 2007); *d) Modulación de la actividad de la polimerasa viral*: NS1 interacciona con el RNA viral (Hatada & Fukuda, 1992; Hatada et al, 1997; Hatada et al, 1992; Marión et al, 1997) y con la polimerasa viral y/o las RNPs (Marión et al, 1997) durante la infección. Estos datos junto con estudios de virus ts mutantes en NS1 (Falcon et al, 2004; Garaigorta et al, 2005) sugieren que NS1 podría estar implicada en la modulación de la polimerasa viral; *e) Estimulación de la traducibilidad de los mRNAs virales*: Durante la infección viral la traducción de proteínas celulares disminuye mientras que se favorece la de las virales. Este fenómeno se denomina *shut off* celular (Park & Katze, 1995). Se ha propuesto que los mRNAs celulares son degradados durante la infección (Beloso et al, 1992; Inglis, 1982; Zurcher et al, 2000) aunque esta degradación es controvertida (Garfinkel & Katze, 1992; Katze & Krug, 1984; Katze & Krug, 1990). Durante la infección tiene lugar una traducción selectiva de los mRNAs virales, pero esta selectividad debe de ser muy regulada ya que los mRNAs virales y celulares son estructuralmente indistinguibles. Hay varios mecanismos descritos que podrían explicar este fenómeno. Por un lado está la unión de NS1 al extremo 5'UTR del mRNA viral (Garfinkel & Katze, 1993). Los extremos de los segmentos de gripe contienen una región común a todos ellos y una región específica de cada segmento. Estas últimas sirven para regular el perfil de expresión cuantitativo y temporal de cada mensajero viral (de la Luna et al, 1995; Enami et al, 1994; Yamanaka et

al, 1991). Por otro lado están los factores celulares implicados en la selectividad y estimulación de esta traducción (apartado 7.2.5); *f) Participación en la morfogénesis viral* (Garaigorta et al, 2005); *g) Control de la maquinaria de defensa celular*. Impide la activación de la PKR a través de su unión a RNAs de doble cadena o dsRNA (Cheng et al, 2008) o mediante la interacción directa entre NS1 y PKR (Hatada et al, 1999; Tan & Katze, 1998). NS1 tiene la capacidad de inhibir el sistema de silenciamiento celular mediado por RNA interferente (Bucher et al, 2004; Li et al, 2004), previene la activación del sistema 2'-5'OAS/RNAsL (Min & Krug, 2006), así como la transcripción de los factores IRF3, IRF7, NFκB y Jun/ATF2 mediante la unión a RIG-I (Guo et al, 2007; Mibayashi et al, 2007; Pichlmair et al, 2006). Tiene además un papel fundamental en la inhibición de la respuesta a interferón que se desencadena en la célula hospedadora al ser infectada con el virus. (Kochs et al, 2007).

La proteína **PB1-F2** induce apoptosis y se localiza en la membrana de las mitocondrias (Gibbs et al, 2003). Esta proteína es un factor importante de patogenicidad (Zamarin et al, 2006), favorece la aparición de enfermedades bacterianas secundarias (McAuley et al, 2007), y regula la actividad de la polimerasa mediante la interacción con la subunidad PB1 (Mazur et al, 2008).

### 3.2 Genoma y RNAs virales presentes en la célula infectada

El virus de la gripe A presenta un genoma segmentado formado por 8 moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis et al, 1976). El genoma completo comprende alrededor de 13500 nucleótidos, según la cepa, y codifica un total de 11 proteínas. Cada segmento da lugar a una única proteína excepto los segmentos 2, 7 y 8 que codifican dos proteínas cada uno (Chen et al, 2001; Lamb & Choppin, 1979; Lamb & Choppin, 1981;



**Figura I2. Estructura del genoma del virus de la gripe.** Los RNAs se representan el polaridad positiva y se muestran las proteínas que codifican. Las líneas negras representan los extremos no codificantes de cada segmento. Los intrones se representan como líneas en forma de V en los segmentos M y NS. A la izquierda se muestra el número de segmento y a la derecha su longitud en nucleótidos y la masa molar de las proteínas que codifican (Adaptado de Palese & Shaw, 2007).

Lamb et al, 1980) (Lamb et al, 1981) (Lamb & Lai, 1980). Los segmentos 7 y 8 expresan dos proteínas cada uno mediante el procesamiento de sus mRNAs por *splicing* y la traducción colineal del RNA no procesado (proteínas M2 y NEP, y M1 y NS1 respectivamente). El mRNA del segmento 2 contiene dos pautas de lectura abierta mediante las cuales tiene lugar la expresión de PB1 y PB1-F2 (Figura I2).

Durante la infección por el virus de la gripe se pueden encontrar en el núcleo de la célula infectada 3 tipos de RNAs virales generados por el complejo replicasa-transcriptasa viral (Figura I3):

**vRNA:** constituye el RNA genómico del virus, de cadena sencilla y polaridad negativa. Es el RNA que se encapsida en forma de ribonucleoproteínas o RNPs durante la formación de la progenie viral. El RNA presenta en sus extremos un 5' trifosfato y un 3'-OH (Young & Content, 1971). Todos los segmentos virales presentan unas secuencias conservadas de 12 y 13 nucleótidos en sus extremos 3' y 5' respectivamente (Desselberger et al, 1980; Robertson, 1979), que poseen complementariedad parcial e

invertida. Como consecuencia de la parcial complementariedad, los extremos de cada segmento forman una estructura en forma de *panhandle* o mango de sartén (Hsu et al, 1987) que permite la circularización de cada segmento y conforma el sitio específico de anclaje de la polimerasa al RNA viral (Fodor et al, 1994; Fodor et al, 1993; Honda et al, 1987) (Figura I3-A). La información contenida en los extremos conservados, que conforman el promotor viral, es relevante para los procesos de replicación, transcripción, poliadenilación y empaquetamiento. Todos los vRNAs contienen además una zona rica en uridinas próxima al extremo 5' que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs virales (Luo et al, 1991). La estructura del promotor viral se describe más adelante.

**cRNA:** Se produce durante la replicación viral a partir de moléculas de vRNA. Son moléculas de polaridad positiva y son una copia completa del molde viral. Constituyen un paso intermedio de la replicación ya que sirven a su vez de molde para generar múltiples copias del vRNA progenie. El vRNA y el cRNA son empaquetados por la polimerasa viral y por moléculas de NP en forma de vRNPs y



cRNPs. A diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo de la célula infectada y no se encapsidan en los nuevos viriones. Igual que el vRNA, el promotor del cRNA tiene también una estructura de mango de sartén, pero se han identificado diferencias estructurales entre ambos que son responsables de una funcionalidad diferente, probablemente porque inducen un reconocimiento diferente por parte de la polimerasa (González & Ortín, 1999b).

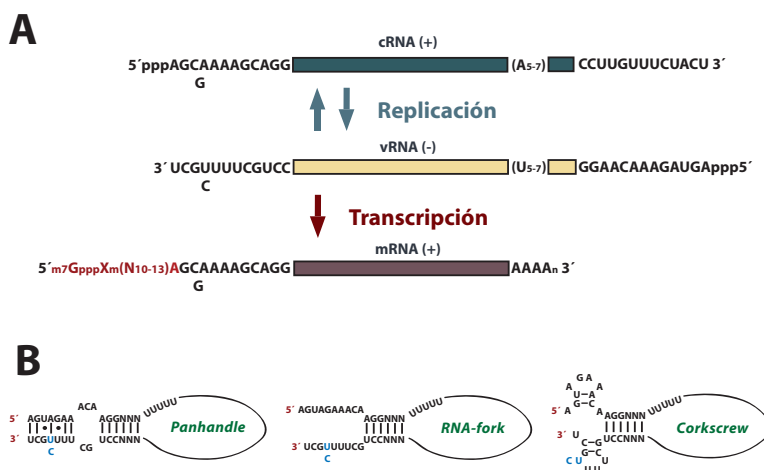
**mRNA:** son generados durante los procesos de transcripción a partir de moléculas de vRNA. Son RNAs de polaridad positiva y presentan en su extremo 5' una estructura *cap* tipo 1 que deriva de mRNAs celulares (Krug et al, 1979) y en su extremo 3' una secuencia polyA de longitud variable. Ambas modificaciones post-transcripcionales dan lugar a mRNAs virales estructuralmente indistinguibles de los celulares.

## 4. LA RIBONUCLEOPROTEÍNA VIRAL

Los segmentos de RNA virales nunca existen como RNAs desnudos sino que se asocian a la RNA polimerasa viral y a moléculas de nucleoproteína (NP) para dar lugar a complejos de ribonucleoproteínas o RNPs (Portela et al, 1999). La proteína mayoritaria de las RNPs es la NP que recubre todo el genoma excepto los nucleótidos terminales parcialmente complementarios, que permanecen unidos a la polimerasa viral (Klump et al, 1997).

### 4.1 La polimerasa viral

La polimerasa viral es una RNA polimerasa dependiente de RNA formada por las subunidades PB1, PB2 y PA (Detjen et al, 1987; Digard et al, 1989) con una relación estequiométrica 1:1:1 (Detjen et al, 1987; Honda et al, 1990; Kato et al, 1985). Las tres subunidades son necesarias para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral



**Figura 13. (A) Diagrama de la síntesis de RNA viral.** El RNA genómico de polaridad negativa se muestra en amarillo. Mediante un proceso de transcripción se generan los mRNAs virales. El mRNA viral, representado en marrón, contiene una estructura cap que proviene de mRNAs celulares y un extremo poliA sintetizado por la polimerasa viral. Mediante un proceso de replicación se generan los intermediarios replicativos (cRNA representado en verde) que sirven como molde para dar lugar a la progenie viral (vRNA). **(B) Modelos de la estructura secundaria propuesta para el promotor viral.** Se representan los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del RNA que conforman el promotor viral (Adaptado de Palese & Shaw, 2007).



en el núcleo de las células infectadas (Perales & Ortín, 1997). Además de la polimerasa presente en las vRNPs, también se ha descrito la presencia del complejo heterotrimérico no unido a las RNPs en el núcleo de células infectadas (Detjen et al, 1987). Estos complejos solubles podrían estar implicados en el reconocimiento de los RNAs intermediarios de replicación y de la progenie viral, ya que se unen de manera específica a las secuencias 5' conservadas y a la estructura de *panhandle* de los segmentos virales (González & Ortín, 1999b; Lee et al, 2003b; Tiley et al, 1994). Además de las funciones en replicación, se ha propuesto que la polimerasa soluble tiene un papel como modulador de la selección del sitio de *splicing* durante el procesamiento de los transcritos primarios del segmento 7 (Shih et al, 1995), y también como protector de los mRNAs virales del proceso de *cap-snatching* realizado por las vRNPs (Shih & Krug, 1996). Aunque las tres subunidades de la polimerasa son necesarias para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral, se han asignado funciones específicas a cada una de ellas.

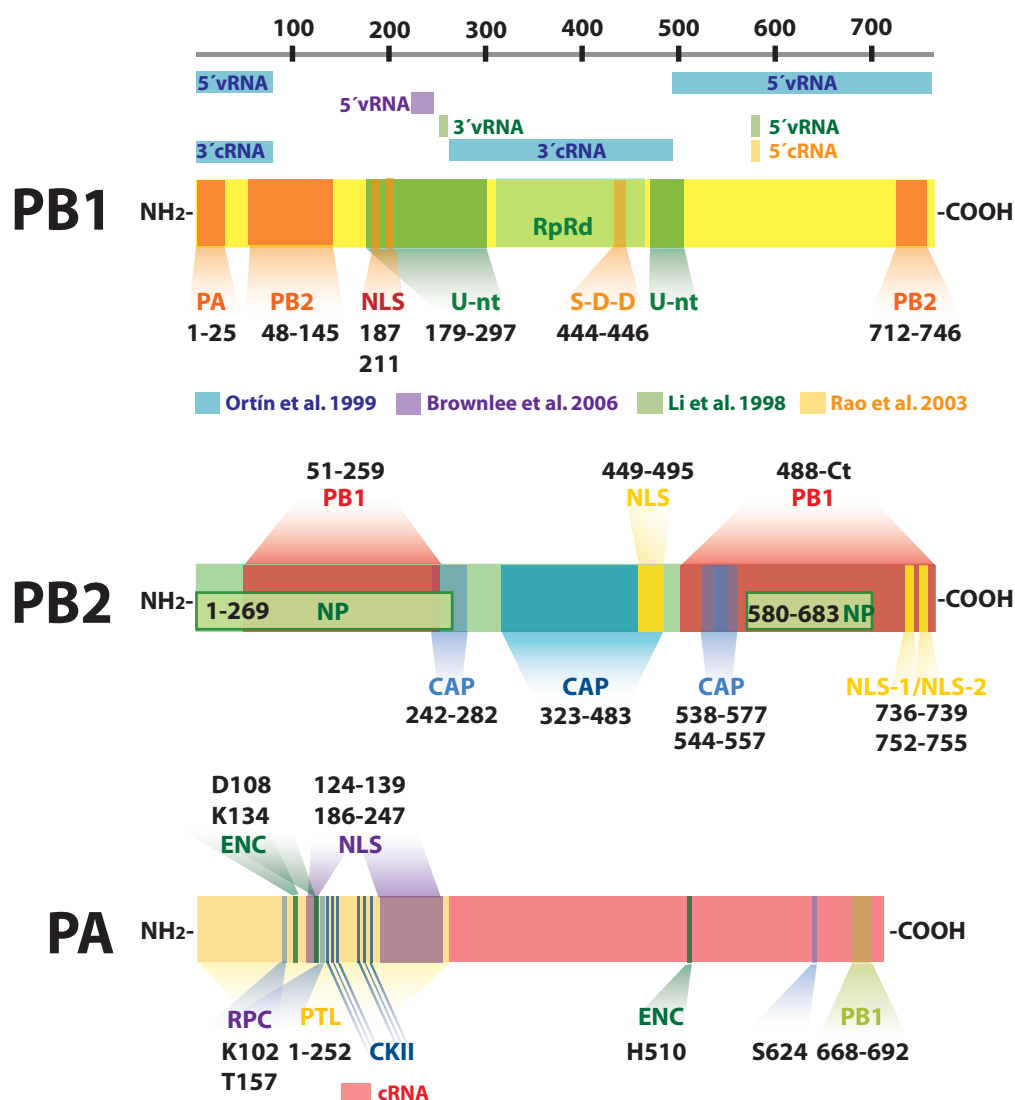
#### 4.1.1 La subunidad PB1

La subunidad PB1 es la más conservada evolutivamente y es responsable de la actividad de polimerización. Presenta cinco dominios comunes a todas las RNA polimerasas dependientes de RNA (Kobayashi et al, 1996; Poch et al, 1990) y mutaciones puntuales en estos residuos afectan dramáticamente su actividad (Biswas & Nayak, 1994; Mahy, 1983). Adyacentes a esta región catalítica se han descrito dos sitios de unión a nucleótido que se han propuesto como dos sitios implicados en la adición de nucleótidos durante la síntesis de RNA (Asano & Ishihama, 1997; Kolpashchikov et al, 2004). La polimerasa viral se asocia al promotor del vRNA con especificidad de secuencia (Tiley et

al, 1994), y PB1 es capaz de contribuir a esta interacción (Fodor et al, 1994; Li et al, 1998). Concretamente, PB1 une de manera específica y diferencial los RNAs molde virales (González & Ortín, 1999b). Sin embargo las regiones de interacción descritas por varios grupos son contradictorias (González & Ortín, 1999b; Jung & Brownlee, 2006; Li et al, 1998) (Figura I4). Se ha observado que el extremo 5' del vRNA interacciona con PB1 con mayor afinidad que el extremo 3', y a su vez mayor por vRNA que por cRNA (González & Ortín, 1999a; González & Ortín, 1999b). Pero a diferencia del vRNA, los extremos 5'y 3'unen PB1 con la misma afinidad (González & Ortín, 1999b). Se ha propuesto que el reconocimiento diferencial de ambas especies de RNA podría reflejar una conformación diferente de la polimerasa en presencia de los diferentes moldes de RNA (González & Ortín, 1999a). Por último, se ha sugerido que la subunidad PB1 podría tener un papel en la regulación de la transcripción ya que mutaciones en esta subunidad afectan la unión al promotor viral del vRNA y la unión a RNA con estructuras *cap* (Kerry et al, 2008).

#### 4.1.2 La subunidad PB2

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la iniciación de la transcripción ya que es la responsable del reconocimiento de estructuras *cap* tipo 1 (Blaas et al, 1982; Ulmanen et al, 1981). Se han descrito varias regiones de PB2 implicadas en el reconocimiento de estas estructuras mediante experimentos de *cross-linking* y de mutagénesis, sin embargo, debido a su heterogeneidad han sido motivo de controversia (Fechter et al, 2003; Honda et al, 1999; Li et al, 2001). Recientemente se ha resuelto la estructura del dominio responsable del reconocimiento y unión de *cap* por difracción de rayos-X. Se han determinado mediante ensayos de mutagénesis los residuos implicados en dicho reconocimiento (Guilligay et al, 2008), que están comprendidos entre los



**Figura I4. Dominios funcionales de las subunidades de la RNA polimerasa viral.** Se representan las tres subunidades de la polimerasa viral. Los primeros 25 aminoácidos de la región Nt de PB1 son suficientes para interactuar con PA (Ohtsu et al, 2002; Perez & Donis, 2001; Pérez & Donis, 1995). La región Ct de PB1 es a su vez suficiente para interactuar con la región Nt de PB2 (González et al, 1996; Ohtsu et al, 2002; Poole et al, 2007). Sin embargo se han descrito dos regiones adicionales de interacción entre PB1 y PB2: la región Nt de PB1 (Biswas & Nayak, 1996) y la región Ct de PB2 (Poole et al, 2004). La región Nt de PA interactúa con PB2 (Hemerka et al, 2009). Las regiones de PB1 responsables de la interacción con el 5'vRNA comprenden los residuos Nt 1-83 y Ct 494-757 (González & Ortín, 1999b), aunque otros estudios sugieren que otras tres zonas en PB1 son responsables de la interacción: i) los residuos 233-244 son responsables de la interacción con el extremo 5'vRNA (Jung & Brownlee, 2006), ii) los residuos F571 y F572 y están implicados también en la unión al 5'vRNA (Li et al, 1998), iii) los residuos 249-256 están implicados en la interacción con el extremo 3'vRNA, siendo los residuos 251 y 254 esenciales dentro de esta región (Li et al, 1998). La subunidad PB1 interactúa con el cRNA mediante sus residuos centrales 266-493 aunque los residuos 1-83 también están implicados. PA interactúa con el cRNA (Maier et al, 2008). NLS: señal de localización nuclear; U-nt: zona de unión a nucleótido; S-D-D: residuos característicos de una RNA polimerasa RNA dependiente (RpRd); ENC: actividad endonucleasa; CAP: dominios de unión a estructuras cap; CKII: dianas de fosforilación por casein quinasa II; RPC: residuos implicados en replicación; PTL: actividad proteolítica.

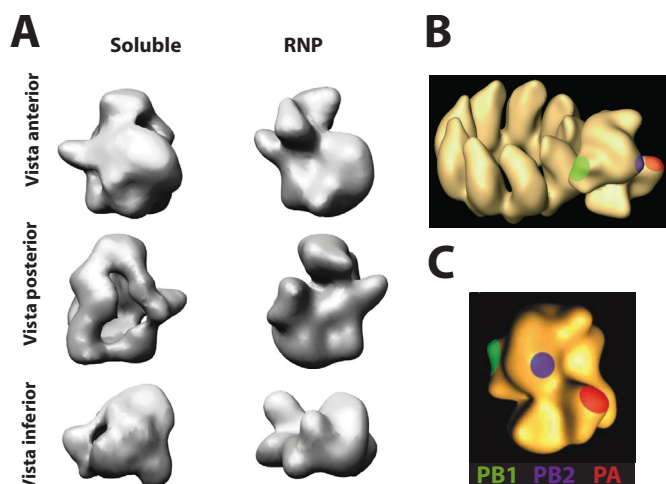
residuos 323 y 483. La proteína PB2, además de estar implicada en transcripción, tiene también un papel en la replicación viral dado que mutantes puntuales en esta proteína dan lugar a defectos en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza et al, 2003) (Figura I4). Al igual que PB1, PB2 es capaz de unir el RNA genómico, según los datos obtenidos por *cross-linking* inducido, aunque se desconoce cual es la región responsable del reconocimiento (Fodor et al, 1993).

#### 4.1.3 La subunidad PA

Hasta hace poco tiempo no se había descrito una función específica de la proteína PA, pero se sabía que su presencia en el complejo de la polimerasa es esencial tanto para los procesos de replicación como de transcripción (Hara et al, 2006; Huang et al, 1990; Mahy, 1983; Perales & Ortín, 1997). PA está implicada en la replicación viral ya que mutantes termosensibles en PA dan lugar a defectos en la síntesis de cRNA y vRNA (Krug et al, 1975). Se han descrito varias mutaciones que afectan específicamente a la actividad endonucleotídica de la polimerasa, sin afectar el reconocimiento de la estructura 5'cap ni de la síntesis de las otras especies de RNA (cRNA y vRNA) (Fodor et al, 2002), lo que sugiere que esta subunidad también participa en la iniciación de la transcripción. De acuerdo con estos datos, un trabajo muy reciente, donde se combinan estudios estructurales del dominio N-terminal de PA con ensayos bioquímicos, ha revelado que este dominio tiene actividad nucleasa y que su estructura es muy parecida a las nucleadas de tipo II (Dias et al, 2009; Yuan et al, 2009). Por tanto, junto con los resultados de Hara et al. se ha propuesto que la subunidad responsable del corte endonucleotídico es PA, y no PB1 como se había descrito anteriormente mediante ensayos de *cross-linking* (Li et al, 1998).

Se ha observado que PA está implicada también en la unión de la polimerasa a estructuras *cap* (Hara et al, 2006). Se ha propuesto que PA es necesaria para la estabilización de la interacción del promotor con la polimerasa (Deng et al, 2005; Hara et al, 2006; Lee et al, 2002), ya que un mutante en PA presenta una alteración en la elongación que desestabiliza la interacción entre la polimerasa y el molde viral dando lugar a la generación de RNAs interferentes (Fodor et al, 2003). Por último, se ha descrito la implicación de PA en la formación de partículas virales dado que virus con mutaciones en los residuos 507-508 en esta subunidad son capaces de sintetizar correctamente los tres tipos de RNAs mientras que la producción de virus está totalmente anulada (Regan et al, 2006). Del mismo modo que PB1 y PB2 interaccionan con el promotor viral, se ha descrito por ensayos de *cross-linking* que PA interacciona con el extremo 5'vRNA (Fodor et al, 1994) y con el cRNA (Maier et al, 2008) (Figura I4).

PA es una proteína fosforilada *in vivo* y susceptible de fosforilación *in vitro* por Casein Kinasa II (Sanz-Ezquerro et al, 1998). Esta subunidad es además capaz de inducir una proteólisis de proteínas tanto virales como celulares (Sanz-Ezquerro et al, 1995). La región responsable se encuentra en el tercio N-terminal de PA (Sanz-Ezquerro et al, 1996) aunque también se han observado actividad serín-proteasa en el extremo C-terminal de la proteína, concretamente en el residuo S624 (Hara et al, 2001). Se ha demostrado que la capacidad para inducir proteólisis está relacionada con la capacidad de síntesis de cRNA (Huarte et al, 2003; Perales et al, 2000), aunque hay resultados contrarios a esta observación (Naffakh et al, 2001).



**Figura 15. Modelo tridimensional de la polimerasa viral y la RNP.**

(A) Modelo estructural de la polimerasa soluble (soluble) y de la polimerasa unida a la RNP (RNP) (Torreira et al, 2007). (B) Modelo tridimensional de la RNP (Martín-Benito et al, 2001; Torreira et al, 2007). (C) Localización de las subunidades de la polimerasa en la polimerasa unida a la RNP (Area et al, 2004).

#### 4.1.4 Estructura y ensamblaje del complejo de polimerasa

La subunidad PB1 forma el núcleo central de la polimerasa flanqueada en su extremo N-terminal por PA y en su extremo C-terminal por PB2. En la Figura 14 se muestran los dominios responsables de las interacciones entre las subunidades (Biswas & Nayak, 1996; González et al, 1996; Ohtsu et al, 2002; Perez & Donis, 2001; Pérez & Donis, 1995; Poole et al, 2004; Poole et al, 2007). Recientemente, mediante ensayos de microscopía (BiFC), se ha observado que los 100 nt N-terminales de la subunidad PA son responsables de la interacción con PB2 (Hemerka et al, 2009), una interacción que hasta el momento no se había podido detectar. Estos datos confirman que estas dos subunidades establecían algún tipo de interacción sugerido por datos estructurales (Area et al, 2004). La estructura tridimensional de la polimerasa ha sido obtenida mediante microscopía electrónica, e indica que las tres subunidades se encuentran asociadas y formando una estructura compacta. Se han obtenido dos modelos, el correspondiente al complejo de la polimerasa que forma parte de la RNP (Area, 2003; Area et al, 2004) y el correspondiente al complejo soluble de la polimerasa (Torreira et al, 2007) (Figura 15-A).

A pesar de que las características generales entre ambas son muy similares, presentan ciertas diferencias estructurales que podrían deberse a un cambio conformacional inducido por la interacción de la polimerasa con NP y el RNA viral. La cristalización del complejo de la polimerasa no ha sido posible de momento, sin embargo se dispone de la estructura de dominios de las subunidades del trímero (Dias et al, 2009; Guilligay et al, 2008; Guu et al, 2008; He et al, 2008; Tarendeau et al, 2007; Tarendeau et al, 2008; Yuan et al, 2009). El mecanismo y localización del sitio de ensamblaje del complejo de la polimerasa no está todavía claro. Cada subunidad puede localizarse en el núcleo de la célula de manera independiente debido a que cada una ellas contiene señales de localización nuclear (NLS) (Mukaigawa & Nayak, 1991; Nath & Nayak, 1990; Nieto et al, 1994). Sin embargo no se conoce ni la región intracelular ni la vía de formación del complejo. Se ha propuesto que PB1 y PA, junto con el factor celular RanBP5, forman un complejo en el citoplasma que se importa al núcleo mientras que PB2 lo hace de manera independiente (Deng et al, 2006a; Fodor & Smith, 2004). De este modo, una vez en el núcleo se formaría el complejo entre PB1-PA y PB2, como sugieren los experimentos *in vitro* (Deng et al, 2005). Propuestas alternativas

se basan en la formación de dímeros entre la chaperona Hsp90 con PB1 y PB2, y sugieren la formación de dímeros PB1-PB2 y PB1-PA (Lee et al, 2003a) y su transporte conjunto al núcleo (Momose et al, 2002; Naito et al, 2007b)

## 4.2 El promotor viral

El promotor viral, como se ha comentado anteriormente, está formado por los nucleótidos terminales tanto del vRNA como del cRNA. Todavía hoy no se conoce con exactitud la estructura del promotor viral a pesar de los numerosos estudios realizados hasta ahora. Existen tres modelos principales (Figura I3-B): a) Disposición en forma de mango de sartén o **panhandle**: ensayos de *cross-linking* y ensayos estructurales apoyan el apareamiento de los nucleótidos terminales del promotor (Bae et al, 2001; Baudin et al, 1994; Desselberger et al, 1980; Hsu et al, 1987; Lee et al, 2003a; Robertson, 1979); b) Disposición en forma de tenedor o **RNA-fork**: respaldada por ensayos de mutagénesis, es una estructura híbrida entre RNA de doble cadena y RNA de cadena sencilla. Se sugiere que la zona de doble cadena es estabilizada por uniones RNA-proteína y proteína-proteína mediadas por la polimerasa viral (Fodor et al, 1995; Kim et al, 1997); c) Disposición en forma de sacacorchos o **corkscrew**: esta estructura está basada en la de RNA-fork, sin embargo propone que los extremos 5' y 3', que no se aparean entre ellos, forman un dúplex consigo mismos. Es decir, que cada uno de los extremos del RNA forman una estructura de *hairpin loop*. Ensayos de mutagénesis apoyan esta estructura (Flick & Hobom, 1999; Flick et al, 1996). Se ha demostrado que la presencia de estas estructuras *stem-loop* en los extremos del RNA son críticas para la activación de la actividad endonucleasa por parte del extremo 5' y para la poliadenilación (Leahy et al, 2001; Pritlove et al, 1999), y que estas mismas estructuras están implicadas en la interacción del promotor con la polimerasa

viral (Brownlee & Sharps, 2002).

Todas estas opciones difieren en la región más terminal, siendo en el primer caso un dúplex y en los otros dos casos secuencias no apareadas entre ellas. De este modo se ha propuesto la conformación cerrada (*panhandle*) para el correcto reconocimiento de la polimerasa, seguida de la conformación abierta (*fork* o *corkscrew*) mediante la separación del híbrido de RNA por parte de la polimerasa.

## 4.3 La nucleoproteína

El componente mayoritario de las RNPs es la nucleoproteína o NP, que une y encapsida el genoma viral. La interacción con el RNA es cooperativa y no específica de secuencia ya que tiene alta afinidad por el azúcar fosfato y deja expuestas las bases (Baudin et al, 1994; Yamanaka et al, 1990). De este modo, esta unión no protege completamente el RNA de la degradación por RNAsas (Baudin et al, 1994). La interacción de NP con el RNA es de una molécula de NP cada 24 nucleótidos (Compans et al, 1972; Ortega et al, 2000). NP es capaz de oligomerizar dando lugar a estructuras semejantes a RNPs en ausencia del resto de sus componentes (Elton et al, 1999; Ruigrok & Baudin, 1995). Se postula que NP es capaz de interaccionar con la polimerasa a través de las subunidades PB1 y PB2, pero no con PA (Area et al, 2004; Biswas et al, 1998; Martín-Benito et al, 2001), y se ha propuesto que esta interacción podría desencadenar cambios estructurales en la polimerasa necesarios para el paso de la síntesis de mRNA a cRNA (Biswas et al, 1998; Medcalf et al, 1999). Se ha descrito también la interacción con M1, que promueve su exportación del núcleo (Martin & Helenius, 1991), inhibe la actividad de las RNPs (Perez & Donis, 1998; Zvonarjev & Ghendon, 1980) y se ha sugerido que está implicada en el ensamblaje de los viriones (Noton et al, 2009). NP es a su vez capaz de interaccionar con

receptores de importación nuclear (O'Neill et al, 1995) a través de sus señales NLS, con la exportina I (CRM1) a través de la señal de exportación nuclear (NES) (Neumann et al, 1997), y con elementos del citoesqueleto celular para llevar a cabo el tráfico de RNPs (Avalos et al, 1997; Digard et al, 1999; Momose et al, 2007; Simpson-Holley et al, 2002).

La proteína NP desempeña un papel esencial en los procesos de replicación y transcripción viral (Mena et al, 1999), en la organización estructural de las RNPs, y es un determinante en la regulación del transporte bidireccional entre el núcleo y el citoplasma de las RNPs durante la infección viral.

#### 4.4 Estructura de la RNP

El estudio de RNPs de viriones mediante microscopía electrónica mostró que se trataba de estructuras súper enrolladas con un *loop* terminal (Compans et al, 1972; Heggeness et al, 1982). La polimerasa está presente en un extremo de esta estructura súper enrollada (Murti et al, 1988) contribuyendo al mantenimiento de la unión de los extremos del RNA (Klumpp et al, 1997). Mediante el uso de un mini-genoma del virus ha sido posible la reconstitución de RNPs recombinantes *in vivo* con la uniformidad necesaria para llevar a cabo estudios de microscopía electrónica de tinción negativa y procesamiento de imágenes, y se ha obtenido un modelo con una resolución de 23Å (Martín-Benito et al, 2001) (Figura I5-B). De un modo similar, el análisis de complejos polimerasa-anticuerpo permitió la localización intramolecular de dominios de cada subunidad (Area et al, 2004)(Figura I5-C).

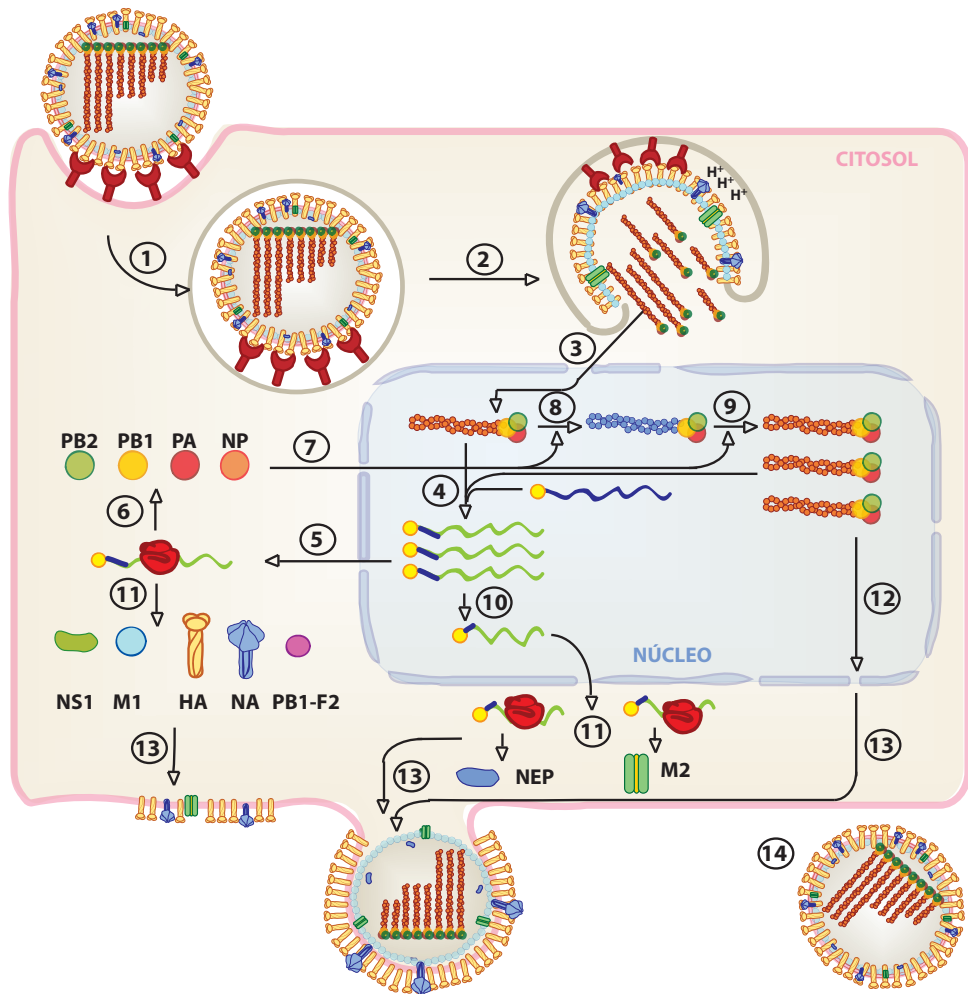
## 5. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

El ciclo viral se desarrolla en células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados y presenta una duración de ocho horas, y está muy bien regulado tanto temporal como espacialmente. Se pueden distinguir varias etapas que se describen a continuación.

### 5.1 Adsorción y entrada de las partículas virales

La adsorción del virus a la célula hospedadora está mediada por la interacción de la glicoproteína HA de la superficie del virus con los receptores celulares que contienen ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos (Weis et al, 1988). Tras la adsorción, la entrada del virus se produce por endocitosis mediada por receptor en vesículas de clatrina (Matlin et al, 1981), aunque se han descrito otras vías implicadas en la internalización del virión (Matlin et al, 1981; Sieczkarski & Whittaker, 2002)(Figura I6-1). Una vez formada la vesícula, ésta se fusiona con lisosomas y se produce una acidificación en el interior que da lugar a la formación de endolisosomas. El pH interno de los viriones disminuye progresivamente gracias al canal iónico que forma la proteína M2 (Pinto et al, 1992) lo que permite la desestabilización de la interacción entre las RNPs y M1 (Figura I6-2). El pH ácido promueve un cambio conformacional de la proteína HA que induce la fusión de las membranas del virus y de la vesícula endocítica (Helenius, 1992). Una vez en el citosol, las RNPs libres de M1 son transportadas al núcleo, gracias a la interacción de NP con la importina  $\alpha$  (Cros et al, 2005; O'Neill et al, 1995), donde tendrán lugar los procesos de replicación y transcripción virales (Figura I6-3).





**Figura I6. Ciclo de infección viral.** Esquema de los pasos de la infección del virus de la gripe. Se representan los mRNAs celulares (en azul), los mRNAs virales (en verde), las cRNPs (en azul) y las vRNPs (en naranja).

## 5.2 Replicación, transcripción y expresión génica

Cuando las RNPs entran en el núcleo de la célula infectada llevan a cabo una primera ronda de transcripción, llamada transcripción primaria (Figura I6-4). Los RNAs mensajeros generados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular (Figura I6-5/6). Las proteínas virales sintetizadas son transportadas al núcleo y provocan el cambio de la síntesis transcripcional a la síntesis replicativa (Figura I6-7). Mediante

la replicación se generan las cRNPs (Figura I6-8) que son intermediarios de la replicación y sirven de molde para dar lugar a las vRNPs progenie (Figura I6-9). A su vez, durante la transcripción secundaria, las vRNPs sirven de molde para dar lugar a los mRNAs virales (Figura I6-4). Este proceso es indistinguible de la transcripción primaria, pero el nivel de síntesis es superior ya que la concentración de vRNPs es muy elevada tras los procesos de replicación (Figura I6-6/11). En este momento, los procesos de replicación y transcripción secundaria están fuertemente acoplados,

mientras que más tarde en la infección se desacoplan y las vRNPs presentes en el núcleo se destinarán a la formación de nuevos viriones.

Los RNAs mensajeros virales, una vez exportados al citosol, deben competir con los mensajeros celulares por la maquinaria de traducción. Los mRNAs son exportados de manera muy eficiente, aunque el mecanismo de exportación no está muy claro. Se ha determinado que la exportación de todos los mRNAs virales, con excepción del de NP y el de NEP, es dependiente de la actividad de la RNAPII (Amorim et al, 2007). El mRNA de NEP podría seguir una vía alternativa mediada por la maquinaria celular de *splicing*. Sin embargo, M2, que debería comportarse igual que NEP, queda retenido en el núcleo en presencia de la droga DRB que inhibe parcialmente la RNAPII. El *splicing* de M2 está regulado por la polimerasa viral, por lo que los autores explican el comportamiento de este mRNA. Finalmente, para el mRNA de NP, que no contiene intrones, sugieren que sigue una ruta de exportación alternativa. Recientemente se ha determinado que el transporte núcleo-citoplasma de mRNAs que no tienen intrones es dependiente de energía, como los RNAs poliadenilados celulares. Hay tres tipos de mRNAs virales: sin intrones (HA, NA, PB1, PB2, PA y NP), con intrones sin procesar por *splicing* (M1 y NS1) y los procesados (M2 y NEP). Para todos ellos se ha propuesto que la exportación del núcleo de estos mRNAs es independiente de la vía CRM1, y que se lleva a cabo mediante la vía celular TAP/p15 con la participación de las proteínas NS1 y la RNA polimerasa II celular ya que colocalizan y se coimmunoprecipitan junto con NS1 y TAP/p15 (Amorim et al, 2007; Wang et al, 2008). Sin embargo, hay que recordar que NS1 forma un complejo inhibitorio con NXF1/TAP, p15/NXT, Rae1/mrnp41 y E1B-AP5 (Satterly et al, 2007), por lo que habrá que seguir investigando

las rutas de exportación y regulación de los mRNAs virales.

En este momento de la infección el virus toma el control de la célula y ejemplo de ello es la relación entre la síntesis de proteínas virales y celulares, siendo esta última casi nula. La proteína viral no estructural NS1, tiene un papel fundamental en el metabolismo de los RNAs mensajeros, dando lugar a la casi exclusividad de la traducción de mensajeros virales durante la infección. Para ello actúa a distintos niveles: regula la actividad de la polimerasa viral, el procesamiento de los mensajeros virales y celulares, inhibe el corte y poliadenilación de mensajeros celulares, promueve la retención en el núcleo de mensajeros celulares poliadenilados así como también su degradación, y estimula la traducción de los mensajeros virales mediante la interacción preferencial con la maquinaria de iniciación de la transcripción. NS1 interacciona con factores de traducción celular que inducen la formación de un complejo de iniciación de la traducción que podría competir con la traducción de los mRNAs celulares.

### 5.3 Morfogénesis viral

En la fase tardía del ciclo comienza la formación de nuevas partículas virales. La formación de viriones se produce por gemación en la membrana plasmática. Por tanto, los distintos componentes estructurales del virus deben confluir en un mismo punto de la membrana plasmática (Figura I6-13). En primer lugar las vRNPs progenie deben ser exportadas hacia el citosol, y son las proteínas M1 y NEP las que desempeñan esta función (Figura I6-12). La proteína M1 forma un complejo de exportación mediante la interacción con NEP y las vRNPs. Dentro de este complejo, la proteína NEP actúa como molécula adaptadora entre el complejo de exportación y el poro nuclear (O'Neill et al, 1998), y además se ha propuesto que NEP



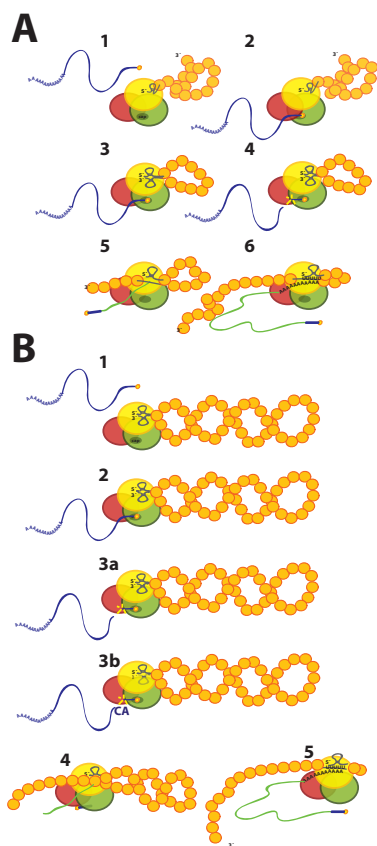
enmascara la NLS de M1 (Akarsu et al, 2003). Por otro lado, la interacción de M1 con la vRNP inhibe la actividad transcripcional de ésta y promueve su transporte al citosol (Watanabe et al, 1996). Se ha propuesto que la vía CRM1 es la responsable de la exportación de las RNPs, ya que NP interacciona directamente con CRM1 y la salida de RNPs queda bloqueada por la acción de la Leptomicina B (Elton et al, 2001; Neumann et al, 2000). Una vez las RNPs se encuentran en el citoplasma son transportadas a la membrana plasmática a través de filamentos de actina (Avalos et al, 1997). La interacción con estos filamentos inhibe la relocalización al núcleo y el transporte a la superficie celular (Digard et al, 1999). Estos complejos se dirigen a zonas concretas de la membrana celular que tienen un alto contenido en colesterol, denominadas *lipid rafts* (Zhang et al, 2000). En esta región también confluyen las proteínas HA, NA y M2. Tras sufrir las modificaciones post-transcripcionales y la autoasociación, son transportadas en vesículas donde el canal iónico M2 regula el pH evitando el cambio conformacional que activaría la proteína HA. La encapsidación de las RNPs parece estar dirigida por M1 (Gomez-Puertas et al, 1999), aunque trabajos más recientes involucran a M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006; McCown & Pekosz, 2006). La liberación de las partículas se produce mediante un fenómeno de gemación o *budding*, y gracias a la acción catalítica de NA, que degrada el ácido siálico de receptores y glicoproteínas virales para evitar su agregación, se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular.

El empaquetamiento del genoma viral requiere de la incorporación de las 8 vRNPs distintas para la generación de virus infecciosos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido que propone la selección de las 8 vRNPs que se incorporan a las nuevas partículas virales.

Entre otras evidencias, cada vRNP en los viriones es equimolar (Smith & Hay, 1982) a pesar de que la relación entre ellas en la célula infectada no es igual. Los vRNAs defectivos interferentes compiten de manera específica con la incorporación de su vRNA homólogo (Duhaut & McCauley, 1996). Recientemente se han identificado secuencias en *cis* presentes en las regiones codificantes y no codificantes en los extremos 5' y 3' de todos los genes, que son necesarias para el empaquetamiento (Fujii et al, 2005; Fujii et al, 2003; Liang et al, 2005; Liang et al, 2008; Muramoto et al, 2006; Noton et al, 2007; Ozawa et al, 2009; Watanabe et al, 2003). Finalmente, mediante cortes seriados de viriones se ha observado una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central (Noda et al, 2006) (Figura 11B). Se cree que la vRNP central corresponde al segmento de PB2 ya que sus secuencias son necesarias tanto para la incorporación de su propio vRNA como para la incorporación del resto de vRNAs en la formación de virus infecciosos (Muramoto et al, 2006).

## 6. PROCESOS DE REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN VIRALES

La transcripción y la replicación son procesos claramente diferenciados. La iniciación de la transcripción depende de un donador de *cap* que actúa como cebador de la polimerasa, mientras que durante la replicación la polimerasa inicia *de novo* la síntesis del RNA. La transcripción implica la terminación prematura de la copia de vRNA en el proceso de poliadenilación, mientras que la replicación da lugar a una copia completa y complementaria del molde utilizado (Hay et al, 1982). Finalmente, el producto de replicación es encapsidado por moléculas de NP (Pons, 1971), mientras que el producto de transcripción no es encapsidado.



**Figura 17. Diagrama del proceso de transcripción viral.** (A) Primer modelo propuesto para los procesos de transcripción: (1) La polimerasa viral se une al extremo 5' del vRNA. (2) Esta interacción activa la unión de PB2 a las estructuras *cap* (en amarillo) de los mRNAs celulares (en azul). (3) La interacción del *cap* estimula la unión de la polimerasa al extremo 3' del vRNA. (4) La interacción de los dos extremos del vRNA activa la endonucleasa que corta los mRNAs celulares a 10-15 nt de la estructura *cap*. (5) Elongación de la transcripción viral. (6) Terminación de la transcripción mediante la síntesis de la cola poliA gracias a la señal de poliadenilación del vRNA. (B) Segundo modelo propuesto para la transcripción: (1) El *panhandle* preformado estimula tanto la unión a estructuras *cap* de mRNAs celulares (2) como el corte endonucleotídico (3a). Los mRNAs que contienen en el sitio de corte la secuencia CA únicamente requieren el extremo 5' para la unión a *cap* y el corte endonucleotídico, mientras que el extremo 3' sirve solo como molde (3b). (4) Elongación del mRNA viral. (5) Poliadenilación y terminación de la transcripción.

A continuación se detallan los mecanismos moleculares descritos para la replicación y la transcripción.

## 6.1 Transcripción viral

La estrategia de transcripción del virus de la gripe es muy distinta de la empleada por otros virus. La polimerasa viral emplea cebadores que ella misma genera para la iniciación de la transcripción. Mediante un proceso llamado *cap snatching* (Bouloy et al, 1978; Krug et al, 1979) la polimerasa reconoce las estructuras *cap* de los pre-mRNAs celulares y los corta para dar lugar a cebadores de entre 9-15 nt con extremos 5' *cap* y 3-OH (Plotch et al, 1981). Estos cebadores son elongados por la polimerasa, y ella misma lleva a cabo el proceso de poliadenilación para dar lugar a los mRNAs virales. De este modo, los mRNAs virales contienen secuencias heterogéneas celulares en su extremo 5', y a su vez resultan estrictamente indistinguibles de los mRNAs celulares.

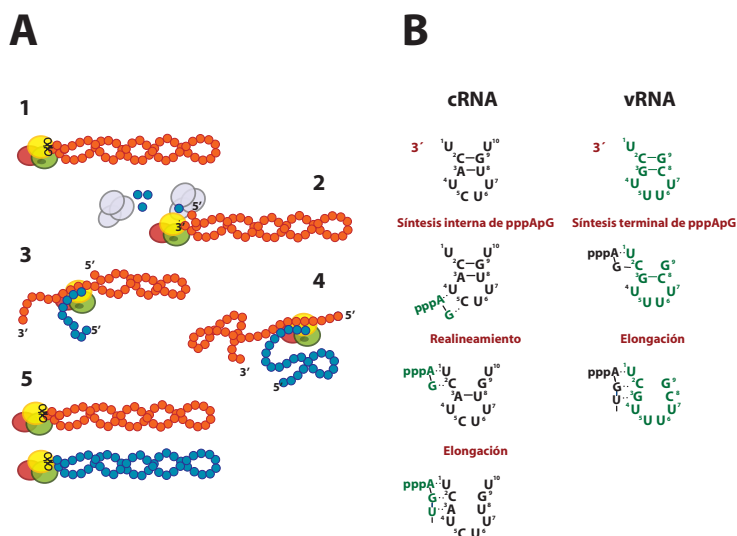
Hasta hace poco tiempo el modelo aceptado de transcripción era el que se describe a continuación (Figura R7-A). Para que la polimerasa adquiriera la capacidad de reconocer y unir las estructuras *cap* es necesario que el extremo 5' del promotor del vRNA se una al complejo (Cianci et al, 1995; Li et al, 1998). La unión del vRNA es concretamente con la subunidad PB1 e induce un cambio alostérico que permite a PB2 el reconocimiento del *cap*. El extremo 5' del cRNA también puede activar la unión de PB2 al *cap* pero de un modo menos eficaz (Cianci et al, 1995). Una vez la polimerasa está unida al *cap* se incrementa la afinidad por la unión de PB1 al extremo 3' del promotor del vRNA. La unión del extremo 3' del vRNA produce un segundo cambio alostérico que activa la endonucleasa para dar lugar al corte de los mRNAs celulares (Cianci et al, 1995; Hagen et al, 1994; Leahy et al, 2001; Li et al, 1998) y

estabiliza la polimerasa viral asociada al RNA (Brownlee & Sharps, 2002). Cabe destacar que la activación del corte endonucleotídico se produce únicamente cuando ambos extremos del vRNA están unidos a la polimerasa (Hagen et al, 1994) y este fenómeno es exclusivo de los extremos del vRNA, ya que el promotor del cRNA no es capaz de dar lugar a la activación (Cianci et al, 1995). De este modo se propone al promotor del vRNA como un cofactor esencial para la actividad de la enzima viral.

Recientemente se han descrito resultados que se contradicen a los anteriores y se propone de este modo un nuevo modelo de transcripción (Figura R7-B). La subunidad PB2 puede unir *cap* independientemente de la ausencia de RNA y del resto de las subunidades de la polimerasa (Guilligay et al, 2008). Se ha observado que el complejo de la polimerasa unido a un dúplex 5'-3' RNA presenta propiedades distintas de aquellas donde la unión al RNA ha sido secuencial. La unión al *cap* y la actividad endonucleotídica son mas eficientes en la formación del complejo mediante la unión al dúplex preformado (Lee et al, 2003b). Además, Rao et al. observaron que cuando el mRNA celular tiene un sitio de corte CA, las funciones del extremo 5'vRNA cambian y éste adquiere la capacidad de activar tanto la unión a *cap* como el corte endonucleotídico, dejando como única función del extremo 3'vRNA la de servir como molde de transcripción (Rao et al, 2003). Finalmente, se ha observado que el corte del mRNA celular se produce de manera preferencial después de una secuencia CA y casi exclusivamente después de una purina (Hagen et al, 1995; Plotch et al, 1981; Rao et al, 2003), siendo una G el primer nucleótido en incorporarse en todos los segmentos virales. Por tanto, la activación de la transcripción mediante un proceso secuencial es controvertido.

A partir de este punto la polimerasa viral lleva a cabo la elongación del cebador hasta llegar al punto de poliadenilación. Los mRNAs de gripe contienen un extremo 3' poliadenilado, sin embargo el origen del poliA es totalmente distinto al de los mRNAs celulares. Es la propia polimerasa la que lleva a cabo la poliadenilación mediante la copia reiterada de un tramo oligo-U presente cerca del extremo 5' del vRNA (Robertson et al, 1981)(Figura I3-A). La polimerasa permanece unida al extremo 5' del molde durante todo el proceso, de modo que ella misma supone un impedimento físico para poder llegar al final de la secuencia y promueve la copia reiterada de Us (Poon et al, 1998; Pritlove et al, 1999). De hecho, se produce una terminación prematura de la transcripción y es por ello que los mRNAs de gripe no son totalmente complementarios al molde viral. Además se ha observado que la substitución tramo de U5-7 por una secuencia de A5-7 da lugar a la formación de mRNAs con una secuencia poliU en su extremo 3' (Poon et al, 1999).

Dos de los transcritos virales, aquellos generados por los segmentos 7 y 8, son sustratos de *splicing* y dan lugar a la expresión alternativa de dos proteínas (M1 y M2, y NS1 y NEP respectivamente) (Inglis et al, 1979; Inglis & Brown, 1981; Lamb et al, 1981). La eliminación de intrones de los transcritos virales es llevada a cabo por la maquinaria celular (Lamb & Lai, 1982; Lamb & Lai, 1984), sin embargo, la polimerasa viral regula la selección del sitio 5' de *splicing* alternativo del mRNA del segmento M. En ausencia de polimerasa se genera el mRNA de M3, pero en presencia del complejo heterotrimérico, éste se une al sitio 5' de *splicing* de M3 y lo enmascara. De este modo, la maquinaria celular de *splicing* reconoce un sitio alternativo y se genera el mRNA de M2 (Shih et al, 1995).



**Figura I8. Diagrama de los procesos de replicación virales.** (A) Esquema de la replicación viral: 1) vRNP con los dos extremos del vRNA unidos a la polimerasa; 2) La presencia de NP y polimerasa activan la replicación viral. Se postula que el extremo 5' se suelta del complejo de la polimerasa; 3-4) Elongación de la replicación y protección del RNA por moléculas de NP. El producto de la replicación es una copia de RNA completa y complementaria del molde; 5) Productos de la replicación viral, las cRNPs (en azul) y vRNPs (en naranja). (B) Modelo del mecanismo de iniciación de la replicación viral. Se muestra la representación del extremo 3' del vRNA (en verde) y del cRNA (en negro), parte del modelo del promotor *corkscrew*. La iniciación *de novo* con molde cRNA empieza en los nucleótidos 4 y 5, y el producto de síntesis, el pppApG, es transferido a los nucleótidos terminales 1 y 2. En contraste con este modelo, la síntesis con molde vRNA empieza directamente en los nucleótidos terminales 1 y 2 (adaptado de Deng et al, 2006c).

## 6.2 Replicación viral

Durante la replicación se generan RNPs complementarias (o cRNPs) y RNPs virales (o vRNPs). La replicación tiene lugar en dos pasos: primero, a partir de las vRNPs paternas (del virión) se generan las cRNPs que son un intermediario de replicación, y a partir de las cRNPs se generan las vRNPs progenie que serán encapsidadas en los nuevos virones (Figura I8-A).

Los cRNAs y vRNAs iniciados *de novo* tienen un extremo trifosfato en su extremo 5' (Hay et al, 1982), siendo un ATP el primer nucleótido incorporado en todos los RNAs virales. Estudios recientes demuestran que la polimerasa viral puede utilizar, aparte de ATP, ADP, AMP y adenosina (Deng et al, 2006b). Sin

embargo la mayoría de los RNAs virales tienen en su extremo 5' un trifosfato debido a que en las células eucariotas la concentración de ATP es mucho mayor que ADP, AMP y adenosina (Brosnan et al, 1990). A diferencia de la síntesis transcripcional, durante la replicación no se requiere la interacción con el extremo 5' del promotor ya que mutaciones en esta región no afecta la síntesis de cRNA o vRNA. De hecho se ha propuesto que esta interacción no debe ocurrir durante la replicación para dar lugar a la síntesis de RNAs sin estructuras *cap* ni poliA (Pritlove et al, 1999). A diferencia de la transcripción, la replicación requiere la síntesis de proteínas virales (Barrett et al, 1979), en concreto NP soluble libre de RNPs, que encapsida el nuevo RNA viral sintetizado (Beaton & Krug, 1986; Shapiro & Krug, 1988). Se cree que NP aumenta la procesividad de la

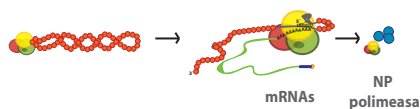
polimerasa durante la replicación (Honda et al, 1988) y resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación, proceso que los autores llamaron antiterminación (Beaton & Krug, 1986).

Existen diferencias entre las estructuras de los promotores de las vRNPs y las cRNPs. Recientemente se ha descrito que la síntesis replicativa utiliza dos estrategias de iniciación distintas en ambos promotores (Deng et al, 2006c)(Figura I8-B). La iniciación de la replicación con molde cRNA ocurre en una zona interna del extremo 3' del promotor (nucleótidos 4U y 5C) y la secuencia sintetizada, pppApG, es realineada con los nucleótidos terminales (1U y 2C) y posteriormente

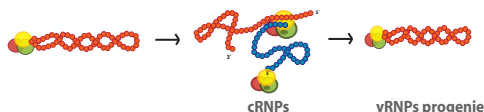
elongada. Sin embargo, la iniciación con molde vRNA empieza directamente en los nucleótidos terminales del extremo 3' del promotor (1U y 2C) y se elonga directamente. El cebador sintetizado a partir del molde cRNA o el molde se liberan de la polimerasa para ser realineados en los nucleótidos terminales. Los autores proponen que estas diferencias en la iniciación de la replicación podría ser un mecanismo de regulación de los niveles de cRNA y vRNA en la célula infectada. Recientemente se ha descrito que un factor celular no identificado es capaz de estimular la síntesis de vRNA a cRNA, pero no viceversa (Nagata et al, 2008). De modo que podría haber varios mecanismos de control de la síntesis de RNA viral. Durante la infección viral la cantidad de cRNA sintetizado es muy inferior a la cantidad de vRNA, y a tiempos tardíos de la infección, la relación entre los vRNAs de los distintos segmentos no es equivalente. La síntesis del vRNA está muy controlada y gracias a esta regulación se expresan proteínas tempranas (polimerasa, NP y NS1) y proteínas tardías (NEP, M1, M2, HA y NA) durante la infección. A diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo durante la infección, hecho que está de acuerdo con la asociación de la replicación a la matriz nuclear (López-Turiso et al, 1990).

#### MODELO DE MODULACIÓN (de polimerasa o promotor)

##### Etapa temprana: transcripción



##### Etapa tardía: replicación



#### MODELO DE ESTABILIZACIÓN

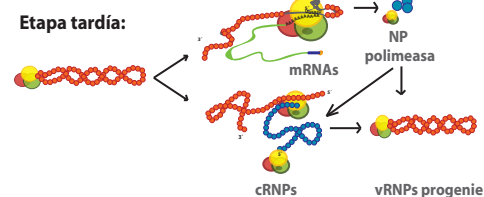
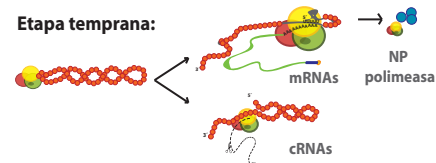


Figura I9. Modelos del cambio de síntesis transcritiva a síntesis replicativa mediante la regulación por NP.

### 6.3 Regulación de los procesos de replicación y transcripción virales

Durante la infección la polimerasa viral lleva a cabo tanto procesos de replicación como de transcripción, pero se desconoce hasta el momento el mecanismo mediante el cual se da el cambio de la síntesis transcritiva a la replicativa. Debe ser un sistema muy regulado ya que el cRNA supone un 5-10% de todo el RNA viral de banda positiva sintetizado durante la infección. Se han propuesto varios modelos.

#### a) Según la composición del complejo viral.

Hay estudios que afirman que complejos binarios pueden llevar a cabo las distintas actividades, es decir, el complejo PB1-PB2 sería necesario dar lugar a la síntesis transcripcional, mientras que PB1-PA daría lugar a la síntesis replicativa (Honda et al, 2002; Nakagawa et al, 1995; Nakagawa et al, 1996). Existe cierta controversia acerca de los elementos requeridos para llevar a cabo la síntesis viral, ya que otros muchos estudios demuestran lo contrario, es decir, afirman que las tres subunidades son necesarias para los procesos de replicación y transcripción virales (Deng et al, 2006b; Fodor et al, 2002; Gastaminza et al, 2003; Huarte et al, 2003; Lee et al, 2002; Perales & Ortín, 1997).

**b) Disponibilidad de NP y polimerasa libre de RNPs.** Se ha propuesto que moléculas de NP de nueva síntesis podrían alterar la RNP molde para permitir el cambio a replicación. De hecho, mutantes termo-sensibles (ts) en NP son deficientes en la síntesis de cRNA y vRNA, mientras que la síntesis de mRNA permanece inalterada (Medcalf et al, 1999; Mena et al, 1999). Hay tres modelos acerca del papel de NP en el cambio de síntesis transcritiva a replicativa (Figura I9).

*b.1) Modelo de modificación de la polimerasa.* PB2 tiene dos dominios que interactúan con PB1 y NP parcialmente solapados. La interacción de PB2 en estos dominios es posible con cualquiera de las dos proteínas pero no de manera simultánea (Poole et al, 2004). Los autores postulan que cuando se acumula NP soluble, ésta entra en el complejo de la polimerasa y reemplaza la interacción de PB2-PB1 por PB2-NP. Durante la transcripción es necesaria la interacción PB2-PB1, por lo tanto sugieren que el cambio de interacciones y la formación de un complejo tetramérico podrían desencadenar el cambio a replicación. Recientemente, otro trabajo muestra que la función de NP como regulador

de la síntesis de RNA viral es independiente de su unión al RNA, lo que es compatible con este modelo (Newcomb et al, 2009).

*b.2) Modelo de modificación del molde viral.* Este modelo propone que la polimerasa viral y/o NP soluble modifican el promotor viral para dar lugar al cambio de transcripción a replicación (Fodor et al, 1994; Klumpp et al, 1997). Mediante ensayos bioquímicos y estructurales se observó que los nucleótidos conservados de los extremos del RNA en una RNP no están expuestos al solvente ni están accesibles a reactivos. Sin embargo, la eliminación de la polimerasa da lugar a la exposición de los extremos del RNA, por tanto, en ausencia de la polimerasa los extremos del RNA no forman la estructura de *panhandle* (Klumpp et al, 1997). De este modo, proponen que la modificación del molde viral por parte de la polimerasa sería un mecanismo para la regulación de la conformación cerrada o abierta del *panhandle*. Es decir, la conformación cerrada sería necesaria para dar lugar a los procesos de transcripción viral, ya que tanto la iniciación como la terminación requieren la estructura del *panhandle* (Fodor et al, 1994; Li & Palese, 1994; Luo et al, 1991). De modo contrario, para la replicación sería necesaria la conformación abierta ya que el extremo 5' terminal debe de estar accesible para su completa replicación.

*b.3) Modelo de estabilización.* Los autores proponen un modelo en el que, a diferencia del anterior, la vRNP viral paterna sintetiza tanto mRNA como cRNA a tiempos tempranos de la infección (Vreede et al, 2004). El cRNA desnudo es inestable y es por tanto degradado por nucleasas celulares. Sin embargo, a tiempos más tardíos, se acumulan proteínas virales sintetizadas, la polimerasa se une al promotor viral del cRNA para estabilizarlo y NP refuerza la transición. Mediante ensayos similares observaron que las vRNPs de los viriones eran



capaces de llevar a cabo simultáneamente la síntesis de cRNA y mRNA en ausencia de factores celulares y virales (Vreede & Brownlee, 2007). De hecho, la primera secuencia que se sintetiza es el extremo 5' cRNA, por el que la polimerasa tiene afinidad (González & Ortín, 1999b), así que sería previsible que una nueva polimerasa sintetizada, distinta de la presente en la vRNP, protegiera el cRNA. Este complejo de polimerasa y RNA podría representar un punto de nucleación para la asociación de nuevas moléculas de NP, y además favorecerían la interacción de esta proteína al RNA viral y no al celular, ya que la interacción NP-RNA no es dependiente de secuencia.

**c) Promotor viral.** Se ha descrito cierta variabilidad en algunas posiciones del promotor como en el nucleótido 4 del extremo 3', ya que existen segmentos que presentan una citosina y segmentos que contienen una uridina en esta posición (Lee et al, 2003a). Se ha propuesto que estos cambios podrían regular los niveles de replicación-transcripción. Los segmentos que codifican las subunidades de la polimerasa contienen en la posición 4' del extremo 3' una C, mientras que la mayoría de los otros segmentos contienen una U (Figura 13-A). La estructura del extremo del promotor con el nucleótido U4 es de doble cadena y por tanto estimularía la actividad endonucleasa y las etapas posteriores para dar lugar a la transcripción. Sin embargo, la estructura del promotor C4 está en equilibrio entre estructuras de cadena doble y sencilla. La estructura abierta (con RNA de los extremos de cadena sencilla) no sería capaz de activar la endonucleasa, permitiendo la iniciación de la replicación (Lee et al, 2003a).

**d) Factores celulares.** Se han descrito varios factores celulares implicados en los procesos de replicación y transcripción virales. La síntesis del RNA viral está muy asociada a la RNA polimerasa II celular y se ha sugerido

que el cambio de síntesis transcriptiva a replicativa podría ser debido a los diferentes factores celulares asociados a la polimerasa celular (Nagata et al, 2008). Los factores celulares implicados en el ciclo viral que han sido descritos se comentan a continuación.

## **7. INTERACCIÓN VIRUS-HOSPEDADOR. FACTORES CELULARES IMPLICADOS EN EL CICLO DE INFECCIÓN**

### **7.1 Interacción virus-hospedador**

Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que la información genética que contienen en su genoma es limitada y requieren de la maquinaria de la célula hospedadora en varios pasos de su ciclo viral. Los virus que contienen como genoma DNA poseen mucha más información genética que los que contienen RNA. Sin embargo, la mayoría de ellos llevan a cabo su expresión génica mediante el uso de polimerasas celulares. Los virus con genoma RNA codifican su propia RNA polimerasa que lleva a cabo los procesos de replicación y transcripción virales. Las células no disponen de la maquinaria necesaria para llevar a cabo una síntesis de RNA sobre un molde de RNA, por lo que se podría suponer que los virus con RNA llevan a cabo su ciclo de infección sin la participación de factores celulares. Sin embargo hay ya muchas evidencias que indican que los virus de RNA requieren y secuestran factores celulares para llevar a cabo los procesos de multiplicación viral. Uno de los ejemplos más claros de la participación de factores celulares en la replicación de RNA viral es el trabajo del grupo de P. Ahlquist (Janda & Ahlquist, 1993). El estudio está basado en un sistema heterólogo de replicación del virus del mosaico del bromo (BMV) en levaduras, que ha permitido la identificación de múltiples factores celulares implicados en varios pasos

de la replicación viral (Noueiry & Ahlquist, 2003). Los virus no sólo se aprovechan de la maquinaria celular sino que además pueden secuestrar proteínas que tienen una función determinada y provocar un cambio de función en el contexto de la infección. El caso del bacteriófago Q $\beta$  muestra un claro y clásico ejemplo. La RdRp del fago Q $\beta$  necesita factores celulares para su funcionamiento: necesita proteínas implicadas en traducción celular para llevar a cabo la síntesis del RNA viral (EF-Tu, EF-Ts, S1) (Blumenthal & Carmichael, 1979; van Duin, 1988), y la síntesis de la cadena negativa utilizando la positiva como molde requiere de la interacción el factor de traducción celular HF1 (Barrera et al, 1993). Existen muchos ejemplos como el del fago Q $\beta$ . En líneas muy generales, los factores celulares se encuentran implicados, entre otros, en los siguientes pasos virales: formación del complejo de la polimerasa viral, implicación en la especificidad de la selección del molde para la replicasa viral, cofactores de la enzima viral, factores implicados en la síntesis in situ de RNA viral, en la formación de complejos estables RNA-proteína, en la compartimentalización de los procesos de síntesis viral requerido por cada virus, etc. (Ahlquist et al, 2003; Lai, 1998). Por tanto, las células no sólo permiten la síntesis viral, sino que participan de modo activo en los procesos de multiplicación viral, y como consecuencia en muchos casos se produce un trastorno en la viabilidad celular.

## 7.2 Factores celulares implicados en la replicación del virus de la gripe

Debido a la limitada información genética que contiene el virus de la gripe, su replicación depende de factores celulares. A continuación se describen aquellas proteínas celulares que se han descrito hasta la fecha como implicadas en cada una de las etapas del ciclo de infección

(Anexo 1.1).

### *7.2.1 Proteínas implicadas en la compartimentalización de la síntesis de RNA viral*

Los procesos de síntesis del RNA viral se llevan a cabo en el núcleo de la célula infectada. Por tanto, no sorprende encontrar componentes de la estructura nuclear entre los factores celulares asociados a proteínas virales. Las vRNPs y M1 interaccionan con los nucleosomas (García-Robles et al, 2005; Takizawa et al, 2006; Zhirnov & Klenk, 1997), lo que está de acuerdo con trabajos anteriores que sugerían que las RNPs en la célula infectada están asociadas fuertemente a la cromatina (Bui et al, 2000; Bukrinskaya et al, 1979), y que la síntesis del RNA viral ocurre en complejos insolubles presentes en la fracción de matriz nuclear (López-Turiso et al, 1990). La interacción de la proteína M1 con nucleosomas podría ser un mecanismo para liberar las vRNPs de la cromatina y transportarlas al citosol. Las proteínas M1, NS1 y NEP interaccionan con ND10/PMLs (Sato et al, 2003) y se cree que esta interacción está relacionada con la alteración de la respuesta celular antiviral. Durante la infección, el nucleolo es el dominio nuclear más alterado estructuralmente por el virus (Anisimova et al, 1980), sin embargo no se conoce la implicación funcional de este complejo en la replicación viral. Mayer y cols. identificaron 11 proteínas nucleolares asociadas a la polimerasa y a las vRNPs, entre las que se encuentran nucleolina y nucleofosmina. Se ha observado que, en presencia del virus, la proteína nucleofosmina relocaliza del nucleolo al nucleoplasma y estimula la actividad de la polimerasa viral (Mayer et al, 2007). La nucleolina también se ha encontrado asociada a NS1 (Murayama et al, 2007). Por último, se ha observado el factor de remodelación de cromatina, CHD6, asociado a la subunidad PA y resultados preliminares sugieren que está implicada en



el ciclo viral (Alfonso-Dunn et al, resultados no publicados).

### 7.2.2 Proteínas implicadas en la síntesis replicativa y en la transcripción viral

Hay muchas evidencias que sugieren que la síntesis de RNA viral está estrechamente relacionada espacial y funcionalmente con la maquinaria de transcripción celular. Se ha descrito la asociación de la polimerasa viral con formas fosforiladas de la RNA polimerasa II (RNAPII) celular a través de su extremo Ct (CTD) (Engelhardt et al, 2005), así como también la interacción con la región promotora de genes de RNAPII (Chan et al, 2006). Esta interacción podría suponer el reclutamiento de las RNPs virales a los complejos macromoleculares de transcripción celular, lugares donde habría mayor disponibilidad de mRNAs celulares para iniciar los procesos de transcripción viral. La RNAPII activa también es necesaria para llevar a cabo la exportación nuclear de mRNAs virales (Amorim et al, 2007). Se ha observado que la polimerasa viral promueve la degradación de la RNAPII celular a tiempos tardíos (Rodríguez et al, 2007) y que interfiere en el proceso de elongación (Chan et al, 2006), fenómenos que pueden contribuir al *shut off* celular. Sin embargo, la degradación de la RNAPII no afecta a la síntesis de mRNA viral, ya que la iniciación de la transcripción celular no se detiene (Chan et al, 2006). No se sabe si la interacción entre la RNAPII celular y la polimerasa viral es directa o indirecta, pero el factor de transcripción celular hCLE podría ejercer de proteína puente entre ambos complejos, ya que se asocia tanto a la polimerasa viral como a la RNAPII (Huarte et al, 2001; Perez-Gonzalez et al, 2006). La proteína celular Ebp-1 es un inhibidor selectivo de la polimerasa viral que se une a la RNP a través de la subunidad PB1. *In vitro* inhibe la síntesis del RNA viral sin afectar las actividades endonucleasa y de unión a *cap* (Honda et

al, 2007). Shimizu y cols. encontraron dos fracciones subcelulares capaces de estimular la síntesis de RNA viral, RAF1 y RAF2 (Shimizu et al, 1994). RAF2 es una helicasa necesaria para la formación del *spliceosoma* que recibe los nombres BAT1/UAP56/NPI5 (Momose et al, 2001; O'Neill & Palese, 1995). UAP56 interacciona con moléculas de NP libres y promueve la interacción con el RNA viral para dar lugar a moldes eficientes para la polimerasa viral, y por tanto estimular su actividad. RAF1 resultó ser la proteína Hsp90 que estimula la síntesis viral, interacciona con la subunidad PB2 y tras la infección, relocaliza en el núcleo junto con PB2 (Momose et al, 2002). Se ha implicado a Hsp90 en la formación del complejo de la polimerasa (Naito et al, 2007b). El complejo celular MCM, una DNA helicasa replicativa implicada en la progresión del ciclo celular, interacciona con las RNPs a través de la subunidad PA, y estabiliza el cRNA naciente con la polimerasa viral (Kawaguchi & Nagata, 2007). La ausencia del complejo tiene como consecuencia una síntesis abortiva de cRNAs cortos, que al no tener una interacción estable con la polimerasa, son liberados del complejo. El complejo MCM y la proteína viral NP podrían actuar durante la replicación viral de un modo cooperativo. El factor Tat-SF1 interacciona con NP libre y estimula la síntesis de RNA viral actuando del mismo modo que UAP56 (Naito et al, 2007a). La RNAPII interacciona con la polimerasa viral, con MCM, con UAP56, y Tat-SF1. Por ello se ha propuesto que la interacción de la polimerasa viral con los macrocomplejos de la RNAPII podría promover la transición de transcripción a replicación, ya que estarían cerca los elementos necesarios para que ésta tuviera lugar: NP asociada a UAP56 o a Tat-SF1 estimularía la formación del complejo NP-RNA, y el complejo MCM estimularía la síntesis de cRNA completo.

### 7.2.3 Proteínas implicadas en inhibición de la transcripción y maduración de mRNAs celulares

Durante la infección por gripe las células sufren cambios en los niveles de traducción de proteínas celulares, proceso llamado *shut-off*. La síntesis de proteínas celulares se reduce drásticamente mientras el virus secuestra la maquinaria de traducción celular para su propio beneficio. Varios procesos celulares están alterados. Como se ha comentado anteriormente, el virus roba los mRNAs con *cap* mediante el proceso de *cap snatching* impidiendo la elongación de los transcritos celulares, e inhibe los procesos de *splicing* y de exportación de mRNAs celulares. El virus da un paso más y mediante la interacción con los factores CPSF y PABPII impide el corte y poliadenilación de los mRNAs, de modo que impide su exportación (Chen et al, 1999; Nemeroff et al, 1998). NS1 forma además un complejo inhibitorio con el complejo de exportación nuclear de mRNAs celulares (NFX1/TAP, p15/NXT, Rae/mnnp41 y E1B-AP5) que podría estar implicado en la retención nuclear de mRNAs celulares a causa de la infección (Satterly et al, 2007).

### 7.2.4 Proteínas implicadas en el *splicing* celular

Las subunidades mayores del *spliceosome* son las snRNPs U1, U2, U4/6 y U5, y estas snRNPs se encuentran asociadas a varias proteínas necesarias para la formación del *spliceosome* y para el *splicing*. Entre ellas están los factores U2AF, SF2, SF3, SF2/ASF y SC35. Durante la infección viral el patrón estructural de SC35, que se localiza en *speckles* junto con el resto de elementos implicados en *splicing*, se desorganiza y adquiere un patrón más difuso (Fortes et al, 1995). La proteína viral responsable de este fenómeno es NS1, y de acuerdo con estos datos, se ha identificado NS1 asociada a varios factores de *splicing*.

Entre ellos está la proteína NS1-BP, que localiza junto con SC-35 en *speckles* (Wolff et al, 1998), y U6 snRNA, cuya interacción inhibe los procesos de *splicing* de pre-mRNAs celulares (Qiu et al, 1995).

### 7.2.5 Proteínas implicadas en la traducción viral

Los mRNAs virales se traducen de modo selectivo frente a los celulares y contienen unas secuencias en *cis*, comunes en el extremo 5' de todos los segmentos virales, que les permiten tener una mayor traducibilidad (Garfinkel & Katze, 1993). La proteína NS1 interacciona con los factores eIF4G (Aragón et al, 2000) y PABP1 (Burgui et al, 2003), une el extremo 5' de los RNAs virales (Park & Katze, 1995) y se localiza en polisomas, favoreciendo la incorporación de ribosomas a los mRNAs virales (de la Luna et al, 1995). Finalmente se ha descrito que la polimerasa viral se une al complejo de iniciación de la traducción celular (Burgui et al, 2007) y a varias proteínas ribosomales (Mayer et al, 2007). Por tanto se ha propuesto que el conjunto de estas interacciones hace posible un mecanismo de circularización específica de los mRNAs virales que favorecería la reiniciación de su traducción. Se ha observado también la interacción del autoantígeno La (Park & Katze, 1995) y GRSF-1 (Park et al, 1999) con las regiones 5' UTR de mRNAs virales, de modo que también podrían participar en la estimulación de su traducción.

### 7.2.6 Proteínas implicadas en transporte de componentes virales

El ciclo de infección necesita un transporte eficiente y dinámico de los componentes virales. Las importinas KPNA1 y KPNA2 (O'Neill & Palese, 1995; Wang et al, 1997) están implicadas en la importación nuclear de las vRNPs de los viriones y de moléculas de NP libres. Para la localización nuclear de las subunidades de la polimerasa y para la correcta

formación del complejo se ha propuesto la implicación dos factores celulares alternativos: Hsp90, comentado anteriormente, y RanBP5, que interacciona con la subunidad PB1 o bien con el dímero PB1-PA (Deng et al, 2006a). Los mRNAs virales deben ser exportados al citosol para su traducción. Se ha observado que la salida de los mRNAs virales no es sensible a la droga LMB y es por tanto, un proceso independiente de la vía CRM1. Sin embargo la proteína NS1 interacciona con los elementos TAP/p15 y ambas copurifican con los mRNAs virales (Wang et al, 2008). Por tanto se cree que los mensajeros virales se exportan por la vía TAP/p15 con la participación de NS1 y la RNA polimerasa II celular (Amorim et al, 2007).

La proteína hStaufen se asocia a NS1 (Falcón et al, 1999), a la polimerasa y vRNPs (S. de Lucas, datos no publicados). La proteína hCLE comentada anteriormente, además de ser un factor de transcripción celular, se ha encontrado formando parte de mRNPs citosólicas junto con hStaufen (Elvira et al, 2006; Kanai et al, 2004; Villacé et al, 2004)(A. Perez, resultados no publicados), por lo que ambas podrían ejercer una función en la última etapa de expresión génica.

Una vez sintetizadas las vRNPs progenie, éstas tienen que ser eficazmente exportadas del núcleo y dirigidas a la zona de formación de los nuevos viriones. La salida de las vRNPs del núcleo es un proceso secuencial en el que primero se une la proteína viral M1 a los complejos ribonucleoproteicos y posteriormente se une la proteína NEP. Esta interacción inhibe la actividad de las vRNPs. El complejo vRNP-M1-NEP interacciona con la proteína CRM1, a través de M1, y con nucleoporinas del poro nuclear, a través de NEP (Elton et al, 2001; O'Neill et al, 1998). Una vez las vRNPs están en el citosol deben dirigirse a la membrana celular donde tienen lugar los

procesos de morfogénesis viral, y para ello las RNPs interaccionan con componentes del citoesqueleto. NP se asocia a los filamentos de actina, lo que provocan una retención citosólica de las vRNPs progenie y permite que sean dirigidas hacia las zonas de *budding* (Digard et al, 1999).

### *7.2.7 Proteínas celulares implicadas en otras funciones*

Las proteínas Mx son inducidas en respuesta a interferón y juegan un papel importante en la respuesta antiviral. Se ha observado que las proteínas Mx-GTPasas inhiben la transcripción viral mediante la formación de un complejo con PB2 y NP (Turan et al, 2004; Zürcher et al, 1992). Recientemente se ha descrito la interacción de la proteína viral PB1-F2 con los factores ANT3 y VDAC1, dos proteínas mitocondriales. Se ha propuesto que PB1-F2 induce apoptosis por la permeabilización de las mitocondrias mediante la interacción con estos dos factores celulares (Takahashi et al, 2007; Zamarin et al, 2005). También está implicada en el ciclo viral la proteína COXA1, componente del complejo citocromo c oxidasa. En ausencia de esta proteína se da una reducción de la síntesis viral (Hao et al, 2008). Dado que PB2 tiene una señal de localización mitocondrial (Carr et al, 2005) y que PB1-F2 se encuentra en las membranas mitocondriales, este orgánulo debe de estar relacionado en algún punto del ciclo viral, aunque de momento no se sabe con certeza su implicación.

### *7.2.8 Proteínas celulares presentes en el virión*

Los virus con envuelta lipídica tienen la capacidad de incorporar proteínas celulares tanto en el interior del virión como en la propia membrana. En un estudio muy reciente se han identificado 36 proteínas celulares incorporadas en el virión de gripe (Shaw et al, 2008). Entre ellas se encuentran proteínas

del citoesqueleto, miembros de la familia de las anexinas, *tetraspanins*, ciclofilina A, CD59, y encimas glicolíticas. La implicación de su presencia en la partícula viral está por establecerse.

## 8. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE REPLICACIÓN EN VIRUS RNA. FENÓMENOS DE OLIGOMERIZACIÓN Y COMPLEMENTACIÓN INTRAGÉNICA

Los virus que contienen RNA codifican su propia RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) ya que la célula hospedadora que infecta no dispone de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la síntesis de sus genomas. Los virus han adoptado diversas estrategias para formar los complejos de replicación (CRs) en los que se encuentran tanto proteínas virales como factores celulares. Sin embargo, estas estrategias pueden diferenciarse según la polaridad del genoma viral, es decir, entre virus de banda positiva y virus de banda negativa.

### 8.1 Virus con genoma RNA de polaridad positiva

La replicación de todos los virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (+ssRNA) requiere de dos condiciones básicas: la formación de un CR donde se incluyen factores virales y celulares, y la asociación de los CRs a membranas lipídicas de nueva síntesis en el citosol. El origen y naturaleza de estas membranas celulares depende en cada caso del virus, ya que muchos inducen la formación de vesículas membranosas mediante distintas proteínas virales. Además, los virus +ssRNA han desarrollado una estrategia para la obtención de la máxima eficiencia de replicación basada en fenómenos de oligomerización y complementación intragénica de las RdRp. Existen varios ejemplos que se resumen a

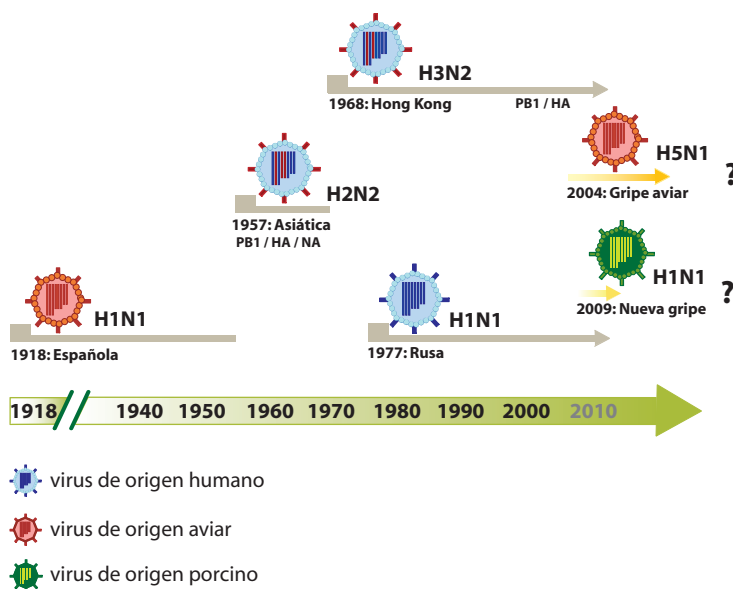
continuación: La RdRp de **Poliovirus** establece interacciones consigo misma (Hansen et al, 1997; Hope et al, 1997; Lyle et al, 2002; Pata et al, 1995; Xiang et al, 1998). Se propone que la funcionalidad de esta interacción es necesaria para la unión cooperativa al RNA (Beckman & Kirkegaard, 1998; Pata et al, 1995) y también para la elongación de la síntesis de RNA de manera cooperativa (Hobson et al, 2001; Pata et al, 1995). Los complejos de RdRps solubles purificados son capaces de formar estructuras bidimensionales que conforman unos entramados o mallas de polimerasas (*polymerase lattices*) que actúan como superficies catalíticas para los procesos de síntesis viral (Lyle et al, 2002). La interacción de dos polimerasas tiene lugar por dos dominios distintos llamados interfaces, y se ha propuesto que una de las interfaces es necesaria para la unión al RNA y la otra está implicada en la actividad catalítica (Hobson et al, 2001). La RdRp del **Virus de la hepatitis C** forma homo-oligómeros (Wang et al, 2002), y la actividad específica de esta polimerasa incrementa de manera dependiente a su concentración, por lo que también ocurre un fenómeno de cooperatividad en la síntesis del RNA viral. Además, la actividad del complejo es inhibida en presencia de un mutante catalítico (Wang et al, 2002). La RdRp de **Flock house virus** requiere de la homo-oligomerización para la síntesis del RNA viral (Dye et al, 2005), y se ha observado que mutaciones que reducen la capacidad de oligomerización a su vez disminuyen la replicación viral. Las RdRp de **Feline calicivirus y Norovirus (NV)** también forman homo-oligómeros (Hogbom et al, 2009; Kaiser et al, 2006). La polimerasa de NV, además de presentar una actividad de modo cooperativo es capaz de formar mallas catalíticas en 2 dimensiones (Hogbom et al, 2009). Las polimerasas de los virus de plantas **brome mosaic virus y tobacco mosaic virus** también forman oligómeros (Goregaoker & Culver, 2003; O'Reilly et al, 1997).

## 8.2 Virus con genoma RNA de polaridad negativa

Los complejos de replicación de los virus de banda negativa son menos conocidos. La polimerasa del **virus de Sendai** es capaz de formar homo-oligómeros. Dos complejos RdRps mutantes en distintos dominios funcionales son capaces de complementarse intragénicamente y restablecer la función de síntesis de RNA (Cevik et al, 2003; Smallwood et al, 2002). En cuanto al **virus de la gripe**, no se han descrito fenómenos de oligomerización de complejos de polimerasas. Sin embargo, en los años 80 varios grupos describieron fenómenos de complementación intragénica entre segmentos de virus termosensibles (ts). En ensayos de coinfección con virus ts mutantes en el mismo segmento, incluso en el mismo gen, eran capaces de recuperar el fenotipo silvestre. Esto se observó para los segmentos 2, 3, 5, 6 y 8 (Heller & Scholtissek, 1980; Mahy, 1983; Massicot et al, 1982; Thierry et al, 1980), que corresponden a los genes PB1, PA, NP, NA y NS respectivamente. Se sabe que la proteína NS1 necesita la conformación de dímero para interactuar con el RNA (Wang et al, 1999), se ha propuesto que NP se incorpora a las RNPs en forma de dímero (Ortega et al, 2000) y que la forma activa de NA es un homotetrámero (Colman et al, 1983; Varghese et al, 1983). Por tanto todas estas proteínas interactúan consigo mismas, motivo que explica la complementación intragénica observada en los virus ts en los segmentos 5, 6 y 8. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la oligomerización de la polimerasa, por lo que no se conoce todavía el mecanismo por el cual los virus ts en segmentos de la polimerasa son capaces de llevar a cabo una complementación intragénica.

## 9. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE. VIRUS HUMANOS Y AVIARES

Cada año los virus de la gripe tipo A causan epidemias en la población humana y en intervalos de tiempo al azar han causado grandes pandemias. Las pandemias están causadas por virus que contienen en su superficie una HA para los que los humanos son inmunológicamente *naive*. Los virus han adquirido varias estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedador mediante un constante cambio antigénico que define la epidemiología del virus. Por un lado, como resultado de mutaciones puntuales se generan pequeños cambios antigénicos, lo que se conoce como deriva antigénica (*antigenic-drift*), y es la causa de las epidemias estacionales. Los virus de la gripe, como todos los virus de RNA, presentan una alta variabilidad debido a la baja fidelidad de copia de la polimerasa durante la replicación y se ha estimado que la frecuencia de mutación por posición en las secuencias virales es de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  (Parvin et al, 1986; Suárez & Ortín, 1994). Pero los cambios antigénicos drásticos, denominados saltos antigénicos (*antigenic-shift*), están causados por el intercambio de genes virales (*reassortment*) o bien por transmisión directa de virus aviaraes a humanos. Los cambios antigénicos son muy graves porque el hospedador no tiene una inmunidad previa que pueda controlar la infección, y los virus se transmiten rápidamente entre la población causando una elevada morbilidad y mortalidad, es decir, generan una pandemia. A lo largo de los años han ocurrido varias pandemias (Figura I10). 1) En 1918 el virus H1N1 provocó la más grave de todas, conocida como gripe española. Todos sus genes eran similares a los presentes en virus aviaraes aunque presenta algunos rasgos característicos de virus humanos, y se cree que ocurrió una transmisión directa de aves a humanos; 2) En



**Figura I10. Pandemias producidas por los virus de la gripe desde el siglo pasado.** Los virus H1N1 eran de origen totalmente aviar, mientras que los virus H2N2 y H3N2 son producto de un cambio antigénico por intercambio de segmentos entre virus aviares y humanos. H2N2 adquirió los segmentos PB1, HA y NA, mientras que H3N2 adquirió los segmentos PB1 y HA. Los virus que actualmente circulan en la población humana son H3N2 y H1N1.

1957 el virus H2N2 provocó una pandemia conocida con el nombre de gripe asiática; 3) En 1968 el virus H3N2 desplazó la cepa H2N2 y provocó la pandemia conocida como gripe de Hong Kong. Tanto el virus H2N2 como el H3N2 son producto de un salto antigénico mediado por el intercambio de genes virales aviares y humanos; 4) En 1977 se produjo una re-aparición de la cepa H1N1 que provocó la pandemia llamada gripe rusa; 5) Desde hace unos años se predice que en cualquier momento puede producirse una pandemia por el virus aviar H5N1 bien por *reassortment* o por transmisión directa de aves a humanos. De momento este virus aviar no ha podido pasar totalmente la barrera inter-especie ya que no se ha adaptado definitivamente para la transmisión de humano a humano; 6) En abril del 2009 se detectó la infección en humanos de un virus H1N1 de origen porcino, cepa llamada nueva gripe. Hasta el momento del cierre de la escritura de esta Tesis no se ha producido una pandemia y la patogenicidad

de la nueva cepa es leve, a pesar de la buena transmisibilidad del virus.

Son muchos los esfuerzos que se han hecho para conocer los factores que determinan tanto la transmisión de virus entre distintas especies como su patogenicidad, y se han descrito varios que se comentan a continuación.

**a) La glicoproteína viral HA:** Hay dos determinantes de patogenicidad relativos a HA: a.1) *El sitio de corte de HA.* La proteína HA es expresada como precursor que es posteriormente cortado en 2 subunidades. Este corte es un prerrequisito para la infectividad viral. Los virus poco patogénicos sólo pueden infectar células del tracto respiratorio ya que las proteasas extracelulares de este sistema son las únicas que reconocen el sitio de corte de HA. Los virus más patogénicos han alterado el sitio de corte siendo accesibles a muchas proteasas ubicuas intracelulares, por lo que se pueden formar virus infectivos en



diversos tejidos (Claas et al, 1998; Fouchier et al, 2004; Hatta et al, 2001; Horimoto & Kawaoka, 1994; Subbarao et al, 1998); a.2) *Especificidad de receptor*. El receptor viral consiste en moléculas de ácido siálico unidas a glicoproteínas y glicolípidos de la membrana plasmática. Los virus humanos reconocen preferentemente moléculas unidas por enlaces  $SA\alpha 2,6Gal$  mientras que los enlaces  $SA\alpha 2,3Gal$  son reconocidos por los aviares (Harvey et al, 2004). En humanos, los enlaces  $SA\alpha 2,6Gal$  se encuentran en el tracto respiratorio superior (mucosas nasales, faringe, tráquea y bronquios). Sin embargo en el tracto respiratorio inferior (bronquiolos y alvéolos) se encuentran los enlaces  $SA\alpha 2,3Gal$ . Las aves, a diferencia de los humanos, presentan enlaces  $SA\alpha 2,3Gal$  en las células del tracto digestivo, donde el virus replica. Por este motivo, aunque eventualmente los virus aviares han conseguido alcanzar el aparato respiratorio inferior de humanos, la replicación y transmisión de humano a humano no es efectiva. Para ello los virus aviares han de mutar y adaptar su HA al reconocimiento de enlaces  $SA\alpha 2,6Gal$ . De hecho, los virus de las pandemias de 1918, 1957 y 1968 se unen preferencialmente a  $SA\alpha 2,6Gal$ , mientras que el virus H5N1 reconoce  $SA\alpha 2,3Gal$ , lo que confirma que los primeros se adaptaron a humanos mientras que al segundo le queda como mínimo un paso previo a la adaptación (Neumann & Kawaoka, 2006).

**b) La glicoproteína viral NA:** NA también tiene especificidad de unión al ac. siálico dependiendo de su tipo de enlace, y sus propiedades estructurales afectan la patogenicidad y el rango de hospedador (Neumann & Kawaoka, 2006).

**c) Componentes de las RNPs:** La polimerasa viral y la NP también están implicadas en el rango de hospedador y en la patogenicidad, siendo la subunidad PB2 una de los

determinantes más importantes. En concreto, la naturaleza del residuo en la posición 627 está asociada al rango de hospedador y la patogenicidad de la infección, aunque todavía no se conoce el mecanismo. Una lisina en esta posición (presente en todos los virus humanos) determina una alta patogenicidad mientras que un glutámico (encontrado en todos los virus aviares) es responsable de una baja patogenicidad en humanos (Subbarao et al, 1993). Se ha observado que una lisina en esta posición favorece la actividad de la polimerasa y la replicación a 37°C, es decir, sería una mutación de adaptación a baja temperatura ya que los virus aviares replican en el intestino de las aves que se encuentra a 41°C. Por tanto PB2 no afecta al tropismo celular del virus, pero sí a la actividad replicativa en ratones y seguramente en humanos. Estos resultados, junto con multitud de otras evidencias experimentales indican que PB2 define el rango de hospedador (Fouchier et al, 2004; Naffakh et al, 2000; Puthavathana et al, 2005; Subbarao et al, 1993). Hay descritos varios residuos asociados a la determinación del rango de hospedador tanto a PB2 como a otras subunidades de la RNP, y se cree que estos cambios no actúan de manera independiente sino que la adaptación de los virus es consecuencia de una constelación de mutaciones (Naffakh et al, 2008).

**d) Otros determinantes: NS1 como antagonista de la respuesta antiviral y PB1-F2:**

Algunos virus altamente patogénicos con mutaciones en NS1 son resistentes a los efectos antivirales de las proteínas IFN y TNF- $\alpha$  y además son capaces de desencadenar una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias que hacen más severa la infección (Neumann & Kawaoka, 2006; Seo et al, 2004). Por otra parte la proteína PB1-F2, que induce apoptosis en la célula infectada,

se ha asociado también a la patogenicidad del virus (Conenello et al, 2007).

Se dispone de mucha información acerca de mutaciones asociadas a la patogenicidad y a la determinación del rango de hospedador. Sin embargo no se conoce el mecanismo mediante el cual estas mutaciones dan lugar a la adaptación de virus aviares a la infección de células humanas. Según la hipótesis más aceptada, estas mutaciones favorecerían la interacción de proteínas virales de origen aviar con factores celulares humanos y en la formación del complejo de la RNP, ya que muchas de las mutaciones se encuentran en dominios implicados en interacciones entre proteínas virales o celulares (Finkelstein et al, 2007). Así, un trabajo reciente con virus aviares adaptados a ratón muestra que la mutación D701N está implicada en la interacción con el factor celular importina- $\alpha$ 1 (Gabriel et al, 2008). Recientemente se ha determinado la estructura de parte del dominio Ct de PB2 donde están incluidas varias posiciones determinantes de patogenicidad, entre ellas la 627. El cambio de Glu a Lys implica una variación en las cargas de la superficie de la proteína que podrían alterar la interacción con factores celulares (Tarendeau et al, 2008). De modo que el estudio de la interacción diferencial de virus aviares y humanos con los factores celulares podría ayudarnos a entender los fenómenos de adaptación de los virus a los distintos hospedadores.







# OBJETIVOS





Al comienzo de esta Tesis se habían descrito varios factores celulares asociados a la polimerasa viral mediante ensayos de doble híbrido, y ensayos de fraccionamiento bioquímico y complementación *in vitro*. Sin embargo no se había realizado un estudio más genérico que permitiera la identificación de complejos celulares asociados a la polimerasa viral *in vivo*. Por tanto nos propusimos realizar un abordaje experimental que permitiera una identificación exhaustiva de factores celulares asociados al complejo viral, así como la caracterización de los complejos intracelulares formados por la polimerasa del virus de la gripe. Para muchos virus que contienen RNA la máxima eficacia biológica de sus complejos de replicación se obtiene mediante la oligomerización y la complementación intragénica de dichos complejos. Sin embargo no se habían descrito estos fenómenos en el ciclo viral de gripe.

Con estos antecedentes el Objetivo general de esta Tesis fue la caracterización de los complejos intracelulares formados por la RNA polimerasa dependiente de RNA del virus de la gripe. En este contexto, nos propusimos los siguientes Objetivos concretos:

*Interacción con factores celulares:*

1. Análisis de los factores celulares asociados a la polimerasa viral recombinante.
2. Estudio de la relevancia funcional de la interacción de la polimerasa viral con factores celulares.
3. Análisis de los factores celulares asociados a la subunidad PB2 de la polimerasa del virus de la gripe.

*Interacción de proteínas virales:*

4. Análisis de la oligomerización de la polimerasa viral recombinante.
5. Estudio de la relevancia funcional de los fenómenos de oligomerización de la polimerasa del virus de la gripe.



# MATERIALES Y MÉTODOS







## MATERIALES

### 1. LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

- **HEK293T**: células embrionarias de riñón humano (Graham et al, 1977) cedidas por T. Zürcher y J.C. de la Torre.
- **HeLa**: células de carcinoma humano, obtenidas de la ATCC.
- **A549**: células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard et al, 1973) cedidas por JA. Melero.
- **MDCK**: células de riñón de perro (Madin & Darby, 1958) cedidas por T. Zürcher y obtenidas de ATCC.

### 2. ESTIRPES BACTERIANAS

- *E. coli* DH5 $\alpha$ : cepa utilizada para la amplificación de todos los plásmidos.

### 3. VIRUS

- **A/Victoria/3/75 (Vic)**, cepa de gripe humana de campo.
- **WSN A<sub>6</sub>**, virus de gripe recombinante adaptado a ratón cedido por G. Brownlee.
- **vTF7-3**, virus vaccinia recombinante que expresa la polimerasa del fago T7 (Fuerst et al, 1987), cedido por B. Moss.

### 4. PLÁSMIDOS

- **pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPA, pCMVNP**,

que contienen los cDNAs de las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa Vic, bajo el promotor CMV de la polimerasa II celular. Fueron construidos y cedidos por J. Ortega (Falcon et al, 2004; Mena et al, 1994).

- **pCMVPB2HIS**, que contiene el cDNA de la subunidad de PB2 con una etiqueta de polihistidinas, fue clonado y cedido por R. Coloma (Guilligay et al, 2008).

- **pGPB1, pGPB2, pGPB2HIS, pGPA, pGNP**, que contienen los cDNAs de las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa Vic, bajo el promotor de la polimerasa del fago T7, han sido descritos previamente (Gastaminza et al, 2003; Mena et al, 1994).

- **pGPB1TAP, pGPB2TAP y pGPATAP**, que contienen el cDNA de las subunidades PB1, PB2 y PA respectivamente con la etiqueta “*tandem-affinity-purification*” (TAP), han sido construidos y cedidos por E. Area (Area et al, 2004; Jorba et al, 2008a).

- **pGPB2-256TAP**, que contiene el cDNA de un mutante de delección de la subunidad PB2 con la etiqueta TAP, fue construido y cedido por E. Torreira (Jorba et al, 2008b).

- **pGPB2GGuaTAP, pGPB2VnTAP y pGPB2ThTAP**, que contienen el cDNA de la subunidad PB2 de distintas cepas virales con la etiqueta TAP, fueron generados y cedidos por P. Resa-Infante (Resa-Infante, 2008).

- **pHH clon 23**, que contiene el vRNA de 248 nucleótidos bajo el promotor de la RNA polimerasa I, fue construido y cedido por R. Coloma.

- **pHH CAT**, que contiene el vRNA del gen CAT con los extremos no traducidos del gen NS, en polaridad negativa, bajo el promotor de la RNA polimerasa I, fue construido y cedido por A. Rodríguez.

- **pT7NSCATRT**, que contiene el vRNA del gen CAT con los extremos no traducidos del gen NS, en polaridad negativa, bajo el promotor de la polimerasa T7, fue descrito previamente (Perales et al, 2000).

- **pSRPURO-TM**, que contiene la secuencia de silenciamiento para *Thermotoga maritima*, fue construido y cedido por R. Alfonso-Dunn.

## 5. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- **PB1-J/K**: suero policlonal generado por inmunización de conejos con la proteína PB1, generado y cedido por N. Zamarreño.

- **PB2 y PA**: anticuerpos monoclonales que reconocen la proteínas PB2 y PA, han sido descritos previamente (Bárcena et al, 1994; Ochoa et al, 1995).

- **NP**: suero policlonal generado por inmunización de conejos con la proteína NP, generado y cedido por N. Zamarreño.

- **M1-M2**: anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente a un epítipo amino-terminal común para las proteínas M1 y M2. Fue cedido por A. García-Sastre (Salvatore et al, 2002).

- **SFPQ/PSF**: anticuerpo monoclonal que reconoce el factor celular SFPQ, fue adquirido a Abcam (ab11825).

- **hnRNP M1-4**: anticuerpo monoclonal que reconoce las distintas isoformas de hnRNP, fue adquirido a Santa Cruz (sc-20002).

- **DDX3**: suero policlonal generado por inmunización de conejos con el péptido DGYGGNYNSQGVWNGN de la proteína

DDX3 acoplado a KLH. La especificidad de los anticuerpos fue analizada por un ensayo de competición con el péptido soluble y análisis por inmunofluorescencia (Jorba et al, 2008b).

- **DDX5**: anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular DDX5, fue adquirido a Abcam (ab10261).

- **8WG16**: anticuerpo monoclonal que reconoce la RNAPII, fue adquirido a Covance.

- **GAPDH**: anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular GAPDH, fue adquirido a Abcam (ab9485).

- **Importina  $\alpha$ 1**: anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína celular importina  $\alpha$ 1, fue adquirido a BD Laboratorios (610485).

- **Importina  $\alpha$ 5**: anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular importina  $\alpha$ 5, fue adquirido a Abnova (H00003836-A02).

- **Importina  $\alpha$ 5-7**: anticuerpo monoclonal que reconoce las proteínas celulares importina  $\alpha$ 5 y 7, fue adquirido a Sigma (I9908).

- **Actina**: anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular actina, fue adquirido a Abcam (ab8227).

- **HA**: anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo de hemaglutinina (HA), fue obtenido de Covance (MMS-101P).

- **His**: anticuerpo monoclonal que reconoce secuencias de polihistidinas, fue obtenido de Sigma (A7058).

- **CBD**: anticuerpo policlonal que reconoce el *calmodulin-binding-site* (CBD), fue obtenido de Upstate (#07-482).

Los anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot (WB) se obtuvieron de Sigma y

- fueron:
- cabra anti ratón unido a peroxidasa de rábano
  - cabra anti conejo unido a peroxidasa de rábano
  - conejo anti rata unido a peroxidasa de rábano
  - ratón anti cabra unido a peroxidasa de rábano
- Los anticuerpos secundarios utilizados para Inmunofluorescencia se obtuvieron de Invitrogen y fueron:
- cabra anti conejo y mono anti conejo unidos a Alexa 488
  - cabra anti ratón, mono anti ratón, cabra anti conejo y mono anti cabra unidos a Alexa 594

## MÉTODOS

### 1. MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES

1.1 Clonaje de los plásmidos pCMVPB2HIS-R142A, pCMVPB2HIS-F130A

Se partió de los plásmidos originales pGEMPB2-R142A y pGEMPB2-F130A descritos anteriormente (Gastaminza et al, 2003), que contienen el cDNA de la subunidad PB2 con distintas mutaciones puntuales que afectan a la replicación viral. Se digirieron los plásmidos con las enzimas de restricción PflMI y XmaI. Se purificaron los fragmentos correspondientes junto con los fragmentos equivalentes provenientes de la digestión del plásmido pCMVPB2HIS y se procedió a su ligación. Las

condiciones de restricción y aislamiento del DNA, así como las de ligación y transformación en células *E. coli* DH5α, han sido descritas previamente (Sambrook, 1989).

1.2 Clonaje de los plásmidos pCMVPB2-E361A, pCMVPB2-H361A, pCMVPB2-K376A, pCMVPB3-F404A

Se hizo un abordaje paralelo al anterior. Se partió de los plásmidos pCMVPB2HIS-E361A, pCMVPB2HIS-H361A, pCMVPB2HIS-K376A, pGEMPB2HIS-F404A descritos anteriormente (Guilligay et al, 2008), que contienen el cDNA de la subunidad PB2 con distintas mutaciones que afectan a la transcripción viral. Se transfirió la secuencia de las proteínas desde los plásmidos pCMVPB2HIS a los plásmidos pCMVPB2 mediante la digestión con las enzimas de restricción XmaI y NsiI.

### 1.3.Clonaje del plásmido pCDNAHAst-NXP2

Para realizar el clonaje del gen de la proteína NXP2 se generó el plásmido pCDNAHA-stuffer.

1.3.1 Clonaje del plásmido pCDNAHA-stuffer

Se generó un fragmento llamado *stuffer* a partir del anillamiento dos oligos de DNA (Tabla M1) que contiene múltiples dianas de restricción. El anillamiento de los dos oligos generó directamente los extremos de las dianas de restricción de las enzimas XhoI y XbaI. Se digirió el plásmido pCDNAHA con las enzimas de restricción XhoI y XbaI y se ligaron ambos fragmentos para generar el plásmido pCDNAHA-stuffer. Con este procedimiento se

Tabla M1. Oligonucleótidos utilizados para generar el fragmento <i>stuffer</i>	
NKB-1	5' TCGAGGCGGCCGGTACCGGTCACCT 3'
NKB-2	5' CTAGAGGTGACCGGTACCGCGCCGCC 3'

añadieron las dianas de restricción NotI, KpnI y BstEII al plásmido original.

### 1.3.2 Obtención del cDNA del gen *NXP2*

Se extrajo el RNA total de células HEK293T mediante el reactivo ULTRASPEC RNA Isolation Reagent (Biotecx) siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvo el cDNA de *NXP2* por amplificación del gen mediante RT-PCR (TITAN) con los oligos específicos 5'NXP2 y 3'NXP2 (Tabla M2). Para introducir las dianas de restricción necesarias para el clonaje se realizó una PCR anillada (LONG EXPAND) con oligos que contenían dichas dianas, NXXHO y NXXBA (Tabla M2), y se rellenaron los extremos por incubación con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. De este modo se obtuvo el cDNA de *NXP2* con las dianas de restricción de XhoI y XbaI en sus extremos.

**Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados para realizar la RT-PCR, la PCR y la PCR anillada.**

5'NXP2	5'CCTGGCTTTGTAGCTCGCTCAAG 3'
3'NXP2	5'GCAAATAATTATCTTACATAACATATACT 3'
NXXHO	5'ACTGAGCTCGAGGCGCGCAGCCACCC 3'
NXXBA	5'CTATGATCTAGATTAAGTACTACTGATTTCACT3'

### 1.3.3. Clonaje del plásmido *pGEM-NXP2*

Para facilitar el clonaje de *NXP2* se realizó un subclonaje de la secuencia del gen en el plásmido *pGEM3*. Se digirió el plásmido con la enzima de restricción *SmaI* y posteriormente se ligó el cDNA de *NXP2*, lo que dio lugar al plásmido *pGEM-NXP2*.

### 1.3.4. Clonaje del plásmido *pCDNAHAst-*

*NXP2*

Para la obtención del fragmento que contiene el cDNA de *NXP2* se digirió el plásmido *pGEM-NXP2* con las enzimas de restricción *PvuI* y *XbaI*. Se rellenaron los extremos mediante la incubación con la enzima *Klenow* y posteriormente se digirió el fragmento con *XhoI*. Este inserto se ligó con el producto de la digestión del plásmido *pCDNAHAstuffer* con las enzimas *XbaI* y *XhoI*. Finalmente se obtuvo el plásmido *pCDNAHAst-NXP2*.

## 1.4 Clonaje de los plásmidos *pSRPURO-stuffer*, *pSRPURO-DDX3*, *pSRPURO-Tm*

Para facilitar el clonaje de secuencias de silenciamiento en el plásmido *pSuperRetro-Puromicina* (*pSRpuro*, *Oligoengine*), se clonó una secuencia adaptadora (*stuffer*) en el plásmido.

### 1.4.1 Clonaje del plásmido *pSRPURO-stuffer*

La secuencia adaptadora (*stuffer*) fue obtenida del plásmido *pSR-GFP/neo*. Se cortaron los plásmidos *pSR-GFP/neo* y *pSRpuro* (*Oligoengine*) con las enzimas de restricción *BglII* y *HindIII*. La secuencia *stuffer* fue ligada al plásmido *pSRpuro* para dar lugar al *pSRPURO-stuffer*.

### 1.4.2 Clonaje del plásmido *pSRPURO-DDX3*

Las secuencias de silenciamiento de *DDX3* fueron diseñadas con el programa *Dharmacon*, fueron sintetizadas y los oligos se anillaron siguiendo las instrucciones de *Oligoengine*. Las secuencias se muestran en la Tabla M3. Se digirió el plásmido con las enzimas *BglII*

**Tabla M3. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje del plásmido *pSRpuro-DDX3***

sn 5'GATCCCCTTAACGAGAGGAACATAAATTCAAGAGATTTATGTTCTCTCGTTAATTTTTA 3'
as 5'AGCTTAAAAATTAACGAGAGGAACATAAATCTCTTGAATTTATGTTCTCTCGTTAAGGG 3'

y HindIII, el vector se purificó de banda y se ligó con los oligos que ya tenían los extremos correctos tras el anillamiento. De este modo se generó el plásmido pSRpuro-DDX3.

2. MANIPULACIÓN DE RNA

2.1 Aislamiento de RNA de RNPs purificadas

Tras la reconstitución y purificación de RNPs recombinantes (apartado 8) se aisló su RNA. Se incubaron las tres primeras eluciones de la purificación durante 1 hora a 37°C con RNA de levadura (100ng/μl), proteinasa K (0,2mg/ml), 0,5% SDS y TNE. A continuación se fenolizaron las muestras tres veces y se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y TNE durante dos horas a -20°C. Tras dos lavados con etanol al 70%, los precipitados se secaron en el *speed-vac* y se resuspendieron en 50μl de H<sub>2</sub>O DEPC.

2.2 Hibridación dot-blot

Los RNAs purificados se mezclaron con un buffer desnaturalizante (10X SSC, 7,5% formaldehído preparado en H<sub>2</sub>O DEPC). Se analizó 1/30 del RNA aislado procedente de la reconstitución de RNPs en 10<sup>7</sup> células, el plásmido pHHclon23 como control positivo y RNA de levadura como control negativo. Todas las muestras se saturaron con 10μg de RNA de levadura. Una vez hervidas las muestras durante 3 minutos, se fijaron en un filtro de nylon y se hibridaron con sondas específicas para cada caso. La preparación de las ribosondas se explica en el siguiente apartado.

Para la hibridación se incubó el filtro en agitación durante 1 hora a 37°C en un *buffer* de prehibridación (6X SSC, 0,5% SDS, 5X Denhardt, 40% formamida desionizada y 75μg/ml DNAss en H<sub>2</sub>O DEPC). Posteriormente se desnaturalizó la sonda mediante su incubación a 100°C durante 3 minutos y se añadió al *buffer* de prehibridación. Se incubó la membrana con la ribosonda toda la noche a 37°C y posteriormente se realizaron lavados seriados. Se llevaron a cabo dos lavados a 65°C durante 30 minutos con un tampón que contenía 1X SSC y 0,1% SDS preparado en H<sub>2</sub>O DEPC. Posteriormente se realizaron 2 lavados más en las mismas condiciones con un *buffer* que contenía 0,1X SSC y 0,1% SDS preparado en H<sub>2</sub>O DEPC. Se analizó el resultado mediante la exposición de pantallas a la membrana y la radiactividad se detectó mediante el Phosphorimager y se cuantificó mediante el programa ImageQuant.

2.3. Obtención de ribosondas para la detección de RNA

2.3.1 Preparación del molde para la ribosonda del pseudo-genoma viral clon23

Se linearizó el plásmido pHH clon23 con la enzima de restricción Apal y mediante la incubación de la reacción toda la noche a 30°C. El plásmido linearizado se utilizó para la amplificación por PCR el fragmento de 249nt correspondientes a la secuencia del clon23. Se utilizaron los oligonucleótidos NS-T3-vRNA y NS-SP6-mRNA (Tabla M4) y las siguientes condiciones de la PCR: 94°C 5 min, 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos, 72°C 7 min, 30 ciclos de

Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento NS (clon23) por PCR	
NS-T3-vRNA	5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGC ATA GTC CAG ATC CAT CGG ACC GTA GTA GAA ACA AGG GTG TTT TT 3
NS-SP6-mRNA	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAC ATA GTC CAG ATC CAT CGG ACC GTA GCA AAA GCA GGG TGA CAA 3'

amplificación. El producto de PCR se purificó mediante fenolización. La fase acuosa se purificó mediante las columnas S300 y el eluido se precipitó mediante la incubación durante 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en presencia de TNE y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Tras dos lavados con etanol al 70% se resuspendió el molde de DNA en 50 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC

### 2.3.2 Transcripción *in vitro* de las ribosondas

La transcripción *in vitro* de ribosondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo usando el molde de DNA descrito en el apartado anterior. Para la detección de los vRNAs se utilizó la ribsonda generada con la polimerasa SP6, y para la detección de los cRNAs se utilizó la generada con la polimerasa T3.

La reacción de transcripción se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Se incubó 300ng de molde de DNA en el *buffer* de transcripción (*buffer* de transcripción 1X comercial, 0,2U/ $\mu\text{l}$  RNAsin, 0,5mM de una mezcla de ATP, UTP y CTP, 10 $\mu\text{M}$  GTP, 5U/ $\mu\text{l}$  de SP6 o T3 y 25 $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (400mCi/pmol)).

### 2.3.3 Purificación y análisis de las ribosondas

Las ribosondas generadas se sometieron a un tratamiento con 10 unidades de DNAsa libre de RNAsas durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se fenolizaron y se purificaron a través de columnas preparadas con la resina Sephadex G50-80 (Sigma) y saturadas con 100 $\mu\text{g}$  de RNA de levadura. La cantidad de radiactividad incorporada se midió en un contador de centelleo Wallac 1410 y se confirmó la integridad y tamaño de la sonda por electroforesis en geles de acrilamida 4%-6M urea. Finalmente se hibridó la sonda con una concentración aproximada de  $10^6$  cpm/ml en las condiciones que se describen en el apartado 2.2.

## 3. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

### 3.1 Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares HEK293T, A549 y HeLa se cultivaron en *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y aminoácidos no esenciales. La línea celular MDCK se cultivó en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y con FBS al 5%. Para la tripsinización de las líneas celulares A549, HeLa y MDCK se utilizó Tripsina-EDTA mientras que para la línea HEK293T se diluyó la solución al 10%. Todas las líneas celulares se mantuvieron a  $37^{\circ}\text{C}$  y con 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 3.2 Transfecciones

#### 3.2.1 Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293T según el protocolo descrito (Wigler et al, 1979). Brevemente, para la transfección de  $1 \cdot 10^7$  células se mezclaron 10-20 $\mu\text{g}$  de DNA en 500 $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  y la mezcla se añadió gota a gota sobre 500 $\mu\text{l}$  de HBS y se incubó durante 1 minuto. Posteriormente se añadió sobre el cultivo celular gota a gota y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Si la finalidad del experimento era realizar una inmunofluorescencia, se cultivaron las células sobre cubreobjetos tratados con polilisina (Sigma) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

El fosfato cálcico también fue utilizado para la transfección de RNPs recombinantes purificadas (apartado 8). La técnica es la misma, pero las mezclas se realizaron con 4-8 $\mu\text{l}$  de la elución más concentrada de RNPs.

### 3.2.2 Infección con vTF7-3 y transfección con fosfato cálcico

Para la expresión de plásmidos que contenían genes bajo el promotor de la polimerasa T7 se llevó a cabo una infección con el virus vTF7-3 y una posterior transfección. Los cultivos celulares se infectaron con el virus a una multiplicidad de 10 UFP (unidades formadoras de placa) por célula (UFP/célula). Tras la adsorción del virus durante 1 hora a 37°C, se cotransfectaron las células con una mezcla de los plásmidos con fosfato cálcico. El medio de cultivo se suplementó desde el momento de la transfección con arabinósido de citosina (AraC) a 50 µg/ml para inhibir la replicación del virus vaccinia empleado.

### 3.2.3 Lipofectamina 2000

Para la transfección de pequeñas moléculas de siRNA (*small interfering RNA*) se llevó a cabo la transfección con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) que se describe en el siguiente apartado.

## 4. SILENCIAMIENTO GÉNICO

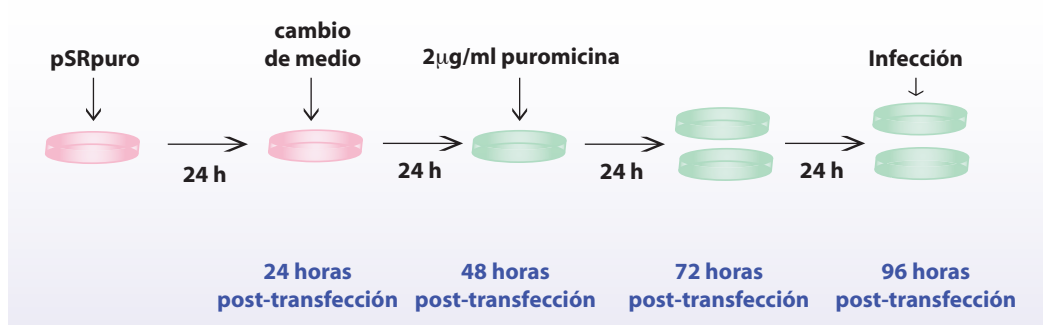
Se ha llevado a cabo el silenciamiento génico mediante dos aproximaciones distintas, pero en ambas se han sido necesarias 72 o 96 horas de tratamiento para ver un descenso de la acumulación de las proteínas celulares.

### 4.1 Silenciamiento mediante el plásmido pSRPURO

El plásmido pRSpuro contiene el gen que confiere resistencia al antibiótico puromicina lo que permite llevar a cabo una selección de las células que hayan recibido el plásmido. Se transfectaron  $10^7$  células HEK293T con 10 µg de plásmido y a las 48 horas post-transfección se incubaron las células con 2 µg/µl de puromicina (Figura M1) y se incubaron durante 48 horas más.

### 4.2 Silenciamiento mediante siRNA

Para el silenciamiento génico en la línea celular A549 se siguió el siguiente protocolo. Se sembraron  $2.10^5$  células en una placa M24, para que al día siguiente estuvieran entre el 60 y el 80% de confluencia. Se realizó una primera transfección. Para ello se incubaron 1,5 µl de Lipofectamina en un volumen final de 50 µl de OPTIMEM (Invitrogen) a temperatura



**Figura M1. Estrategia de silenciamiento génico con shRNAs.** Se transfectó la línea celular HEK293T con los plásmidos pSRpuro-DDX3 o pSRpuro-TM. A las 48 horas post-transfección se añadió al medio de cultivo 2 µg/ml de puromicina para la selección de células transfectadas y se mantuvo hasta las 96 horas post-transfección.



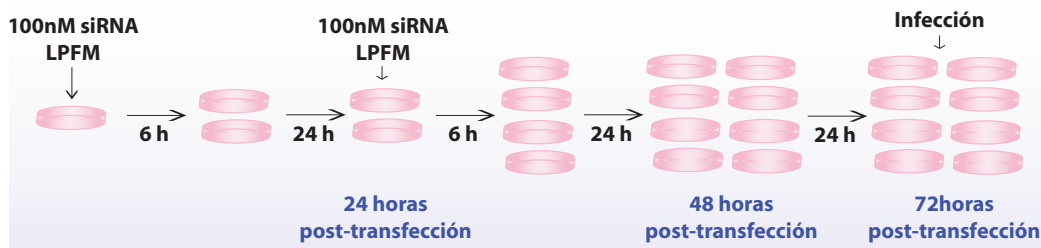
**Tabla M5. Secuencia de los siRNAs**

Proteína	Referencia	Secuencia
hnRNPM	M2, ref. 17303	sn 5'GGAAGGAGAAAAACAUAAtt 3' an 5'UUUAUGUUUUUCUCCUUCtc 3'
SFPQ	S2, ref 107613	sn 5'GGCAUUUGAACGAUGCAGUtt 3' as 5'ACUGCAUCGUUCAAUGCCtt 3'
DDX5	secuencia sintetizada	sn 5'CCGCAACCAUUGACGCCAUtt 3' as 5'AUGGCGUCAUUGGUUGCGGtt 3'
DDX3	secuencia sintetizada	sn 5'UUAACGAGAGGAACAUAAtt 3' as 5'UUUAUGUCCUCUCGUUAAtt 3'
GAPDH	ref. AM4633	No facilitada por la casa comercial
CTRL-	ref. AM4611	No facilitada por la casa comercial

ambiente (TA) durante 15 minutos. Esta preparación se mezcló con 50µl de OPTIMEM que contenían 2,5 µl de siRNA 20µM (para tener una concentración final en la placa de cultivo de 100nM de siRNA) y se incubó a TA durante 15 minutos más. Finalmente la mezcla de transfección se añadió sobre el cultivo con 400µl de DMEM-10%FBS y se incubó durante 6 horas a 37°C. Se retiró el medio con la solución de transfección y se dividió el cultivo en dos placas M24. A las 24 post-transfección se realizó una segunda trasfección. Después de la incubación de 6 horas las células se dividieron de nuevo en dos placas M24. A las 48 horas post-transfección se dividieron las células en dos placas M24 y se incubaron hasta las 72 horas post-transfección (Figura M2).

Para la transfección de HEK293T se siguió la misma aproximación pero con algunos cambios: se sembraron  $4 \cdot 10^5$  células, se utilizaron 2µl de Lipofectamine por placa M24 y 3,75µl de siRNA 20µM (para tener una concentración final en la placa de cultivo de 150nM de siRNA). Finalmente, los cultivos se mantuvieron con DMEM-1%FBS.

Los siRNAs fueron adquiridos a Ambion. Los siRNAs de hnRNPM, SFPQ, GAPDH y del Control negativo fueron diseñados por Ambion y los de DDX5 y DDX3 fueron solamente sintetizados por la casa comercial. La secuencia de DDX3 se diseñó con el programa Dharmacon y la secuencia de DDX5 ha sido descrita previamente (Jalal et al, 2007). Los RNAs se



**Figura M2. Estrategia de silenciamiento génico con siRNAs.** Distintos siRNAs se transfectaron en la línea celular A549 con Lipofectamine2000. Se utilizó una concentración final en el cultivo celular de 100nM siRNA. A las 6 horas post-transfección (hpt) se lavaron los cultivos y se subcultivaron en dos nuevas placas. Tras 24 hpt se repitió la transfección de siRNAs y a las 6 hpt se subcultivaron. A las 48 hpt se subcultivaron en las placas necesarias y se incubaron 24 horas más. Finalmente, tras 72 hpt se realizaron los ensayos biológicos.



reconstituyeron en H<sub>2</sub>O a una concentración de 100µM. Los siRNAs que dieron lugar a un silenciamiento génico de como mínimo un 60% se muestran en la Tabla M4:

## 5. TÉCNICAS VIROLÓGICAS

### 5.1 Infecciones

Las infecciones con las distintas cepas de virus se realizaron a una multiplicidad de infección (mdi) de 10 (alta multiplicidad) unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula) o  $10^{-3}$  UFP/célula (baja multiplicidad), según se indique en cada experimento. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes y subcultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en tampón PBS completo (PBSc) suplementado con 5µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), en el caso de los virus de gripe, o en DMEM en el caso del virus vTF7-3. Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a TA en el caso de los virus de gripe y a 37°C en el caso del virus vaccinia para que tuviera lugar la adsorción. Tras la hora de incubación se retiró el inóculo de virus y se incubaron las células con DMEM al porcentaje de FBS que correspondiera para cada tipo celular. En los experimentos de baja multiplicidad con la cepa Vic de gripe se suplementó el medio con 2,5 µg/ml de tripsina y se omitió el FBS. En el caso de infección con la cepa Vic en la línea celular A549 se realizó con 1,25µg/ml de tripsina.

### 5.2 Generación de *stocks* de virus

Se infectaron monocapas de células MDCK a baja mdi ( $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  UFP/célula). Tras 36-60 horas de incubación a 37°C y cuando el efecto citopático observado alcanzó el 50% de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 2500 rpm para

retirar desechos celulares y se guardaron congelados a -80°C.

### 5.3 Titulación de virus mediante ensayo en placa

Se infectaron monocapas de células MDCK con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en tampón PBSc suplementado con 5µg/ml BSA y se incubaron durante un mínimo de 48 horas a 37°C en un medio semisólido que contenía DMEM, 0,7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2,5µg/ml de tripsina (en el caso de virus Victoria). Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO} = (\text{Nº de placas} * 1/\text{Factor de dilución}) * (1/\text{Volumen del inóculo vírico (ml)})$$

### 5.4 Curvas de crecimiento

Se infectaron monocapas de células HEK293T ó A549 a la multiplicidad especificada en cada experimento y se recogieron alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos post-infección. Posteriormente se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes mediante de titulación por ensayo de placa. En los casos señalados se llevaron en paralelo triplicados de cada punto de la cinética viral. Se recogió el sobrenadante de cada réplica y se preparó una mezcla con el sobrenadante de los triplicados. La mezcla es la muestra de la cual se analizó la infectividad por duplicado.

**Tabla M6. Relación de anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia.**

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
NP	Conejo	1:5000
NP	Rata	1:2000
SFPQ	Ratón	1:500
hnRNPM	Ratón	1:100
DDX3-H	Conejo	1:500/1:1000
DDX5	Cabra	1:750
HA	Ratón	1:1000
Ac secund.		1:400

## 6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 6.1 Marcaje metabólico *in vivo* de proteínas virales

El marcaje *in vivo* de proteínas virales se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito (Zurcher et al, 2000). Brevemente, tras 72 horas de silenciamiento génico las células fueron infectadas a alta mdi. A distintos tiempos post-infección se lavaron las células y se incubaron durante 30 minutos en medio DMEM carente de los aminoácidos metionina y cisteína. A continuación se trataron las células durante 1 hora con el mismo medio suplementado con  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys (200  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Tras el marcaje, se recogieron los extractos totales en tampón PBSc, se realizó un tratamiento de deglicosilación (descrito en el apartado siguiente) y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía.

### 6.2 Deglicosilación de proteínas en extractos celulares

Tras el marcaje *in vivo* de proteínas virales se realizó un tratamiento de deglicosilación. Se recogieron las células en tampón PBSc y se prepararon extractos en tampón TNE-1%Igepal-CA-630. Se añadió un tampón denominado *Glycoprotein Denaturing Buffer* (New England Biolabs) y se desnaturalizaron las

muestras hirviéndolas durante 10 minutos. Se incubaron los extractos con la enzima PNGase F (New England Biolabs) durante 3 horas a 37°C según las indicaciones del fabricante.

## 6.3 Inmunofluorescencia

Se prepararon cultivos de HEK293T o A546 sobre cristales de 10 mm de diámetro. Tras su infección o transfección, las células se lavaron con PBSc, se fijaron durante 20 minutos con formaldehído al 3% a TA y se permeabilizaron con 0,5% Tritón-X-100 durante 5 minutos. Las células se bloquearon con PBS 3% BSA o con BLOTTO (PBS- 0,5% Tween 20- 20% FBS) y se incubaron durante 1 hora a TA con anticuerpos primarios. Tras realizar 3 lavados con PBS se incubaron las células con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos durante 1 hora a TA y en oscuridad. Finalmente las células se lavaron con PBS y las preparaciones se montaron con ProLong (Invitrogen). Las imágenes se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot 200 equipado con una unidad confocal BioRad Radiance 2100. Se obtuvieron secciones ópticas cada 0,2 o 0,3  $\mu\text{m}$  utilizando el software LaserSharp v5.0 (BioRad) y las imágenes se procesaron con el programa LaserPix v4 (BioRad).

La tinción del DNA de los núcleos celulares se realizó con dos reactivos distintos: DAPI (visible con rojo lejano) o TopRo (visible con azul). Los anticuerpos primarios utilizados en los distintos experimentos se resumen en la Tabla M6.

## 6.4 Western Blot

El análisis de proteínas se realizó mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado y transferencia a membranas de Immobilon (Millipore). Los filtros se bloquearon con una solución de BSA al 3% en PBS previamente a su incubación con anticuerpos específicos.

**Tabla M7. Relación de anticuerpos utilizados en ensayos de Western Blot.**

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
PB1	Conejo	1:1000
PB2 (20C /22A)	Ratón	1:50 a 1:200 c.u
PB2 (20/22/25)	Ratón	1:200 c.u.
PA-2	Ratón	1:250
PA-9	Ratón	1:500
NP	Conejo	1:5000
M1-M2	Ratón	1:200
SFPQ	Ratón	1:1000
hnRNPM	Ratón	1:5000
DDX3-I	Conejo	1:1000
DDX5	Cabra	1:1000
8WG16	Ratón	1:500
GAPDH	Ratón	1:5000
Importina $\alpha$ 1	Ratón	1:500
Importina $\alpha$ 5	Ratón	1:500
Importina $\alpha$ 5-7	Rata	1:500
Actina	Conejo	1:1000
HA	Ratón	1:1000
HIS	Ratón	1:2000
CBD	Conejo	1:2000
Anti ratón	Cabra	1:3000
Anti conejo	Cabra	1:10.000
Anti rata	Conejo	1:7.000
Anti cabra	Ratón	1:10.000

Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de PBS-0,1% BSA. Las diluciones de los anticuerpos utilizados se resumen en la Tabla M7. Se incubaron las membranas durante una hora a TA y tras 3 lavados con PBS-0,25%Tween 20 se incubaron con los anticuerpos secundarios preparados en PBS-0,05%Tween 20. El análisis de la señal en los filtros se detectó mediante reacciones de quimioluminiscencia (Amersham).

## 6.5 Tinción de geles de acrilamida

### 6.5.1 Tinción de plata

Los geles de poliacrilamida-SDS se fijaron con 25% etanol y 10% ácido acético durante 1 hora a TA. Los geles fijados se trataron 3 minutos con 1% ácido nítrico y posteriormente se incubaron 30 minutos con una solución sensibilizante (5% w/v tiosulfato sódico- 0,5M acetato sódico- 30% etanol). Tras 3 lavados de 5 minutos con agua, los geles se incubaron con 0,25% nitrato de plata y se lavaron dos veces con agua durante 1 minuto. Los geles se revelaron mediante una reducción con 2,96% carbonato sódico y formaldehído al 0,03%. Tras el revelado, se paró la reacción con 10% ácido acético.

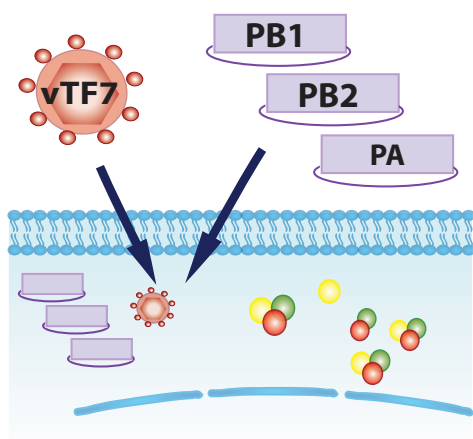
### 6.5.2 Tinción con PageBlue

Los geles de poliacrilamida-SDS se fijaron con 25% isopropanol y 10% ácido acético durante 1 hora a TA. Tras 3 lavados de 10 minutos con agua se incubaron los geles con 20ml de PageBlue (Fermentas) durante 1 hora. Para la visualización de las bandas se realizaron como mínimo 3 lavados con agua.

## 7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPLEJOS DE POLIMERASA VIRAL RECOMBINANTES

### 7.1 Expresión de complejos de polimerasa TAP

La reconstitución del complejo de polimerasa viral recombinante con la etiqueta TAP se llevó a cabo en la línea celular HEK293T. Se infectaron cultivos de  $3 \cdot 10^7$  células en placas de 150mm con el virus vaccina recombinante vTF7-3 y posteriormente se transfectaron como se ha descrito en el apartado 2.2.2. Para ello se utilizó una mezcla de plásmidos que



**Figura M3. Sistema de reconstitución de polimerasa viral recombinante.** Se infectó la línea celular HEK293T con el virus Vaccinia recombinante (vTF7-3) que expresa de forma constitutiva la RNA polimerasa del fago T7. Posteriormente las células fueron transfectadas con los plásmidos que contienen el cDNA de las subunidades PB1, PB2 y PA bajo el promotor de la RNA polimerasa de T7.

codificaban las subunidades de la polimerasa, 9µg de pGPB1, 9µg de pGPB2 y 1,8µg de pGPA. Dependiendo del experimento, los plásmidos que generaban las copias silvestres de las subunidades fueron substituidos o co-transfectados con los que expresaban las subunidades con la etiqueta TAP, y en algún caso con la etiqueta His. Tras 16-18 horas de incubación a 37°C se recogieron los extractos como se describe a continuación (Figura M3).

## 7.2 Purificación de complejos de polimerasa TAP

### 7.2.1 Obtención de los extractos celulares

El protocolo de extracción ha sido descrito previamente (Ortega et al, 2000). Las células infectadas y transfectadas en placas de 150mm se recogieron en PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 rpm a 4°C. Tras un

lavado con PBS se resuspendieron en 750µl de tampón de lisis AT (100mM Tris-HCl pH8-1mM EDTA pH8-7,5mM sulfato amónico pH7.9-0,025% Igepal CA-630) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche) y 50µg/ml de RNasa A. Tras una incubación de 2 horas a 0°C con agitación de la mezcla cada 20 minutos con vórtex, se llevó a cabo la clarificación del extracto por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se recogió el sobrenadante y se procesó según cada caso.

### 7.2.2 Purificación de la polimerasa viral recombinante TAP

Los extractos celulares se llevaron hasta una concentración final de 150mM cloruro sódico y 0,5% de Igepal CA-630. Se diluyó 10 veces el extracto con el tampón IPP150 (10mM Tris-HCl pH8-150mM cloruro sódico-0,5% Igepal CA-630), se suplementó con inhibidores de proteasas (Roche) y se incubó durante 16-24 horas a 4°C con resina IgG-Sepharose (Amersham-Pharmacia). Se añadieron 50µl de cama previamente equilibrada con tampón IPP150 por cada  $3 \cdot 10^7$  células. Se lavó la resina con 50 volúmenes de tampón IPP150 en columna con vacío muy lento. Del mismo modo se equilibró con 25 volúmenes de tampón de corte de la proteasa TEV (10mM Tris-HCl pH8-150mM cloruro sódico-0,5% Igepal CA-630-0,5mM EDTA pH8-1mM DTT) y se incubó la resina con la proteasa TEV, según las indicaciones del fabricante (Invitrogen), durante 3 horas a TA. Se recuperó el sobrenadante y se llevó hasta una concentración final de 2mM CaCl<sub>2</sub>. Se hicieron 6 lavados de 2 volúmenes de tampón de unión a calmodulina, CBB (10mM  $\beta$ -mercaptoetanol-10mM Tris-HCl pH8-150mM cloruro sódico-0,5% Igepal CA-630-1mM acetato magnésico-2mM cloruro cálcico-1mM imidazol), para recuperar todo el complejo eluido. Finalmente se incubó el sobrenadante con 30µl de resina

de calmodulina-agarosa (Stratagene) en CBB, previamente equilibrada en el mismo tampón, durante 16-20 horas a 4°C. Tras un lavado con 100 volúmenes de CBB en columna y vacío muy lento se eluyó el material unido con tampón de elución (10mM  $\beta$ -mercaptoetanol-10mM Tris-HCl pH8-150mM cloruro sódico-0,5% Igepal CA-630-1mM acetato magnésico-2mM EGTA-1mM imidazol). Se realizaron sucesivas eluciones con 1 volumen de resina. Tras 1 minuto de incubación con el tampón de elución se centrifugó a 3000rpm y las muestras se guardaron a 0°C. Para algunos experimentos los tampones se prepararon con 0,1% de Igepal CA-630.

### 7.3 Cromatografía de exclusión molecular

Se analizaron 20 $\mu$ l de las fracciones de elución de la resina de calmodulina-agarosa más enriquecidas en polimerasa mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl-S400 (Sigma) de 2 ml. Tras lavar la columna con 2 volúmenes de H<sub>2</sub>O se equilibró con el tampón con el que queríamos obtener la muestra o bien con el mismo tampón en el que estaba el complejo de la polimerasa. Se añadió la muestra y se recogieron 60 fracciones de aproximadamente 30-35 $\mu$ l (dos gotas). Posteriormente la columna se lavó con 2 volúmenes de H<sub>2</sub>O y se volvió a equilibrar para su calibración. Se preparó una mezcla de marcadores en el mismo tampón en el que se encontraba nuestra muestra: azul dextrano, tiroglobulina (1mg/ml), ferritina (5mg/ml), catalasa (1mg/ml) y BSA (1mg/ml).

## 8. RECONSTITUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNPS

### 8.1 Reconstitución de RNPs in vivo

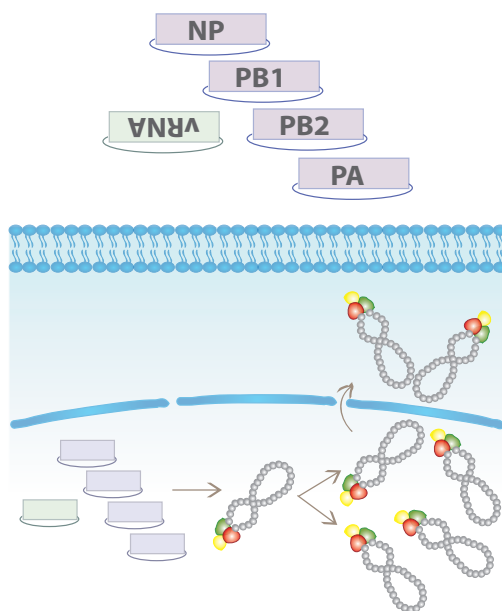
Se reconstituyeron RNPs con una etiqueta de poli-histidinas (*His*) en la subunidad PB2. Se transfectaron células HEK293T con fosfato cálcico (descrito en el apartado 2.2.1) con una mezcla de plásmidos que codificaban las tres subunidades de la polimerasa, NP y un pseudo-vRNA con el gen de la polaridad negativa de la enzima CAT (para 1.10<sup>7</sup> células se transfectaron 3 $\mu$ g de pCMVPB1, 3 $\mu$ g de pCMVPB2 o pCMVPB2HIS, 0,6 $\mu$ g de pCMVPA, 12 $\mu$ g de pCMVNP y 6 $\mu$ g de pHHCAT) (Figura M4). Después de 24 horas de incubación a 37°C se recogieron las células con PBS y se guardaron a -20°C para su posterior análisis.

También se reconstituyeron RNPs con la etiqueta TAP. Como los plásmidos disponibles con dicha etiqueta estaban bajo el promotor de la polimerasa del fago T7 se llevó a cabo una reconstitución paralela a la descrita en el apartado 6.1 pero con la inclusión de los plásmidos pGNP (36 $\mu$ g) y pT7NSCATRT (18 $\mu$ g).

### 8.2 Purificación de RNPs mediante cromatografía de afinidad con la etiqueta de poli-histidinas

Los extractos celulares necesarios para la purificación de RNPs se obtuvieron como se ha descrito en el apartado 7.2.1 pero con algunas diferencias. El cóctel de inhibidores de proteasas era carente de EDTA (Roche), se suplementó el tampón AT con inhibidores de RNAsas 1u/ $\mu$ l (RNasin), se suprimió el tratamiento con RNasaA y todos los tampones fueron preparados en agua DEPC.

Se recogieron cultivos de 1.10<sup>7</sup> células y se resuspendieron con 250 $\mu$ l de tampón AT. Una vez obtenidos los extractos se diluyeron en 4,5ml de tampón de unión a níquel, TN20



**Figura M4. Sistema de reconstitución de RNPs virales recombinantes.** Se co-transfectó la línea celular HEK293T con cuatro plásmidos que contienen el cDNA de las subunidades PB1, PB2, PA y NP bajo el promotor de CMV, junto con un plásmido que expresa un pseudo-replicón en polaridad negativa (pHH-CAT o pHHclon23)

(50mM Tris-HCl-100mM cloruro sódico-5mM cloruro magnésico-0,1% Igepal CA-630-20mM imidazol-pH8-10mM  $\beta$ mercapto-etanol). Se incubó el extracto con 30  $\mu$ l de cama de la resina  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-agarosa (Probond-Invitrogen) a 4°C durante 16-20 horas en presencia de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche). La resina se lavó con 100 volúmenes en columna con vacío muy lento con el tampón TN20. Finalmente el material retenido en la resina se eluyó con 4 lavados de 30  $\mu$ l de tampón de elución, TE175 (20mM Tris-HCl- 100mM ClK- 5mM  $\text{MgCl}_2$ - 0,1% Igepal CA-630- 175mM imidazol- pH8-10mM  $\beta$ mercapto-etanol) y el material obtenido se guardó a 0°C para posteriores ensayos.

## 9. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS RNPs

### 9.1 Transcripción *in vitro*

El ensayo de transcripción *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Perales et al, 1996). RNPs purificadas según el procedimiento descrito anteriormente (apartado 8.2) se incubaron con tampón de transcripción, TT (50mM Tris-HCl pH8-2mM cloruro magnésico-100mM cloruro potásico-1mM DTT- Actinomicina D 10  $\mu$ g/ml-1U/ $\mu$ l RNasin-1mM ATP-1mM CTP-1mM UTP-10  $\mu$ M GTP-10  $\mu$ Ci  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (400  $\mu$ Ci/mmol)). Se emplearon como cebadores de la transcripción 10  $\mu$ g/ml mRNA de  $\beta$ -globina humana (Gibco) o 100  $\mu$ M ApG (Sigma). Tras 1 hora de incubación a 30°C los productos de la reacción se precipitaron con 10% ácido tricloroacético (TCA) en presencia de 0,5  $\mu$ g de RNA de levadura, y fueron filtrados en vacío sobre un filtro de nylon en un aparato de dot-blot. Tras sucesivos lavados con 5% TCA y 1% pirofosfato, se expuso la membrana con una pantalla sensible a  $^{32}\text{P}$  (Molecular Dynamics), se analizó la señal mediante el escáner STORM y se cuantificó con el programa ImageQuant.

### 9.2 Determinación de proteína CAT

Para analizar la proteína CAT correspondiente a la actividad transcripcional de RNPs reconstituidas *in vivo* se utilizó el *kit* comercial de Roche, y se siguieron las instrucciones del fabricante.

## 10. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

### 10.1 MALDI-TOF

Las proteínas de interés fueron recortadas manualmente de geles de poli-acrilamida previamente teñidos con plata (5.5.1) o bien con PageBlue (5.5.2), según lo indicado en cada experimento. La identificación de las proteínas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*), descrito previamente en (Jorba et al., 2008b). Brevemente, las proteínas fueron digeridas en el gel con tripsina porcina y los péptidos resultantes se eluyeron del mismo para ser analizados automáticamente en un espectrómetro de masas Reflex IV MALDI-TOF Bruker, equipado con fuente de iones SCOUT. Para la identificación de las proteínas, los espectros de huella peptídica de cada una de las proteínas analizadas fueron enviados al motor de búsqueda MASCOT 2.1 (Matriz Science), a través del programa Biotools 2.0 (Bruker Daltonics), para efectuar la búsqueda en la base de datos pública *NCBI nr*. En las identificaciones validadas la probabilidad asignada a la proteína candidata era en todos los casos mayor que el límite mínimo fijado como significativo, con un p-valor menor que 0,02.

### 10.2 MS-MS

Las proteínas asociadas a PB2 se separaron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con PAGE-blue (Fermentas). Las proteínas de interés se recortaron manualmente del gel y fueron procesadas como se describe en (Jorba et al., 2008b). Los espectros de huella peptídica de cada proteína y el posterior análisis de MS-MS, se obtuvieron automáticamente con el analizador MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems, Framingham, MA). Para

la adquisición y generación de la lista de picos de cada espectro se utilizó el *software* 4000 Series Explorer v3.5.28193 (Applied Biosystems). Para la identificación de las proteínas, la combinación de los datos de la huella peptídica y de MS-MS, se llevó a cabo con el uso del *software* GPS Explorer v3.6 (Applied Biosystems) y se contrastó con la base de datos pública *NCBI nr* mediante el *software* MASCOT 2.1 (Matriz Science, London, UK). En las identificaciones validadas la probabilidad asignada a la proteína candidata era en todos los casos mayor que el límite mínimo fijado como significativo, con un p-valor menor que 0,02.





# RESULTADOS





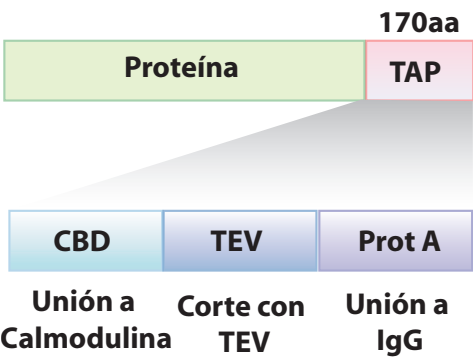
# 1. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE CON FACTORES CELULARES HUMANOS

Los virus de la gripe, como todos los virus, son parásitos intracelulares obligados y su ciclo infeccioso depende en gran parte de la maquinaria celular. Muchos son los esfuerzos que varios grupos de investigación han realizado para comprender la interacción del virus de la gripe con la célula hospedadora. Al comienzo de esta Tesis otros laboratorios ya habían abordado esta cuestión mediante distintas aproximaciones. Se habían identificado factores celulares que interactuaban con subunidades de la polimerasa del virus de la gripe mediante ensayos de doble híbrido, así como también factores implicados en la replicación de RNPs mediante ensayos bioquímicos. En ese momento nos planteamos la posibilidad de realizar un abordaje proteómico más genérico que permitiera obtener un conjunto de factores celulares que interactúan con la polimerasa del virus de la gripe, con la finalidad de entender las funciones de la RNA polimerasa del virus de la gripe durante la infección viral con una visión más general.

## 1.1 Identificación de factores celulares asociados a la RNA polimerasa viral

### 1.1.1 Expresión y purificación de los complejos de la polimerasa viral recombinantes

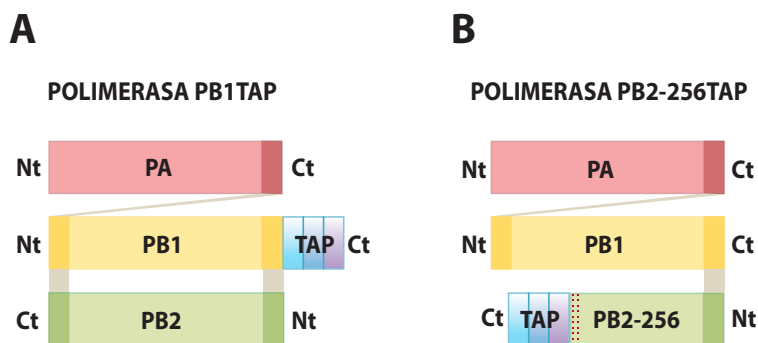
Con el objetivo de identificar posibles factores que interactúan con la RNA polimerasa del virus de la gripe se llevó a cabo la reconstitución *in vivo* del complejo trimérico y su posterior purificación con el



**Figura R1. Esquema de la etiqueta TAP.** La etiqueta TAP está formada por tres dominios distintos: a) CBD (calmodulin binding domain), es una secuencia que presenta alta afinidad por calmodulina en presencia de iones  $Ca^{2+}$ ; b) TEV, es una secuencia de siete aminoácidos que es procesada por la proteasa TEV; c) ProtA, dominio de la proteína A que presenta alta afinidad por moléculas de IgG. Todas las fusiones con la etiqueta TAP utilizadas en este trabajo son C-terminales.

sistema TAP (*Tandem Affinity Purification*). Esta aproximación fue optimizada en el laboratorio en la línea celular de mono COS-1 para el estudio estructural de la polimerasa viral (Torreira et al, 2007), que permitió la obtención de un complejo con pureza y en cantidades razonables para su estudio por microscopía electrónica. En la presente Tesis Doctoral se han optimizado la expresión en células humanas y la purificación en condiciones menos estrictas para la preservación de las interacciones de factores celulares humanos con la polimerasa viral.

Se utilizó el sistema de purificación por TAP porque permitía realizar dos pasos de cromatografía de afinidad en unas condiciones muy suaves (Rigaut et al, 1999). La etiqueta TAP contiene tres regiones diferenciadas: un dominio de la proteína A de unión a IgG, la secuencia de corte reconocida por la proteasa de TEV y un dominio de alta afinidad para calmodulina en presencia de calcio (Figura R1). Esto permitió realizar un primer paso de purificación por unión de los complejos

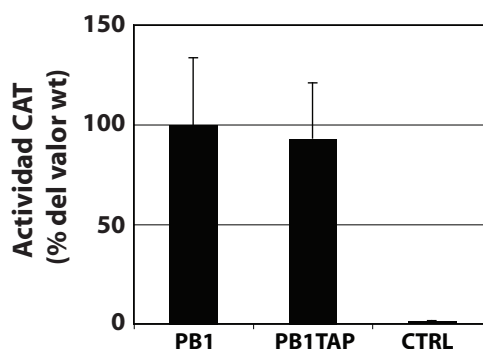


**Figura R2. Diagrama de los complejos de polimerasa viral recombinantes.** El esquema muestra los distintos complejos utilizados, la polimerasa PB1TAP (A) y la polimerasa PB2-256TAP (B). Las interacciones entre las distintas subunidades se representan en líneas marrones. La delección del mutante PB2-256 se muestra con una línea punteada roja.

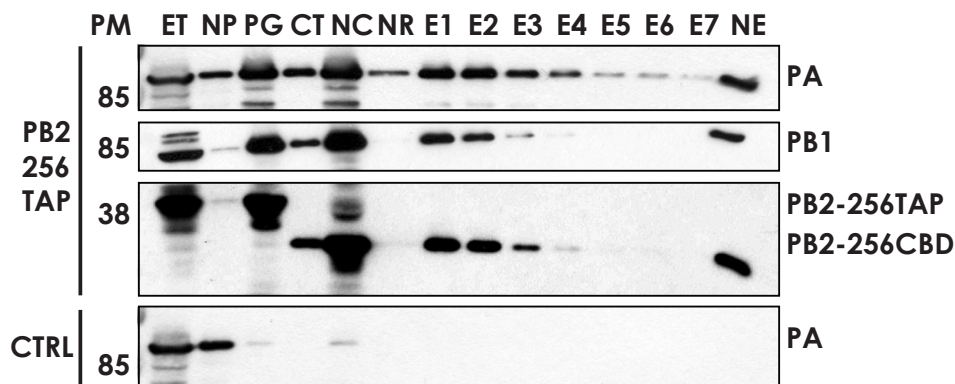
a la resina de IgG-Sepharose. Mediante la digestión específica de la etiqueta TAP con el corte específico de la proteasa TEV se eluyó el complejo para realizar la segunda purificación por unión a una resina de calmodulina-agarosa. Finalmente la polimerasa se eluyó en presencia de EGTA (apartado 7 de Materiales y Métodos).

Se llevó a cabo la reconstitución de la polimerasa viral mediante la cotransfección de plásmidos que codifican las tres subunidades del complejo en la línea celular humana HEK293T. Se reconstituyeron dos complejos distintos: uno con la etiqueta TAP en la región C-terminal de la subunidad PB1 (polimerasa PB1TAP, Figura R2-A) y otro mutante donde la etiqueta se insertó en el extremo C-terminal de la subunidad PB2 delecionada (polimerasa PB2-256TAP, Figura R2-B). Con el fin de analizar la funcionalidad del complejo PB1-TAP *in vivo*, se reconstituyeron RNPs recombinantes cuyo RNA contenía el gen de CAT en polaridad negativa (apartado 8 de Materiales y Métodos). De este modo, las RNPs que replicaran y transcribieran correctamente darían lugar a la expresión del gen CAT. La acumulación de la enzima CAT se analizó como medida de la actividad biológica de dichas RNPs (Figura R3). La polimerasa con la etiqueta TAP en

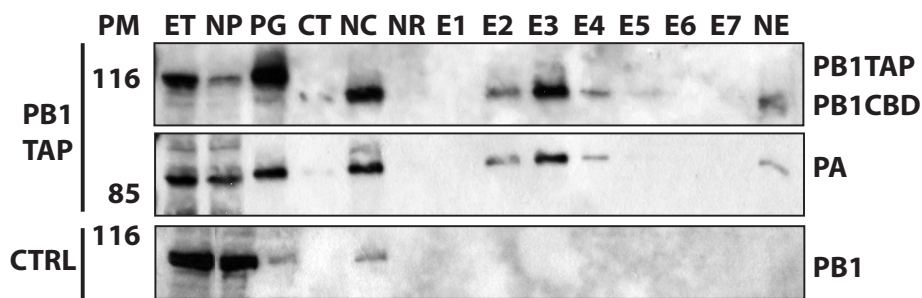
la subunidad PB1 es capaz de replicar y transcribir el RNA del mismo modo que las RNPs silvestres sin la etiqueta TAP, de acuerdo con resultados anteriores (Area et al, 2004). El complejo formado con el mutante de delección



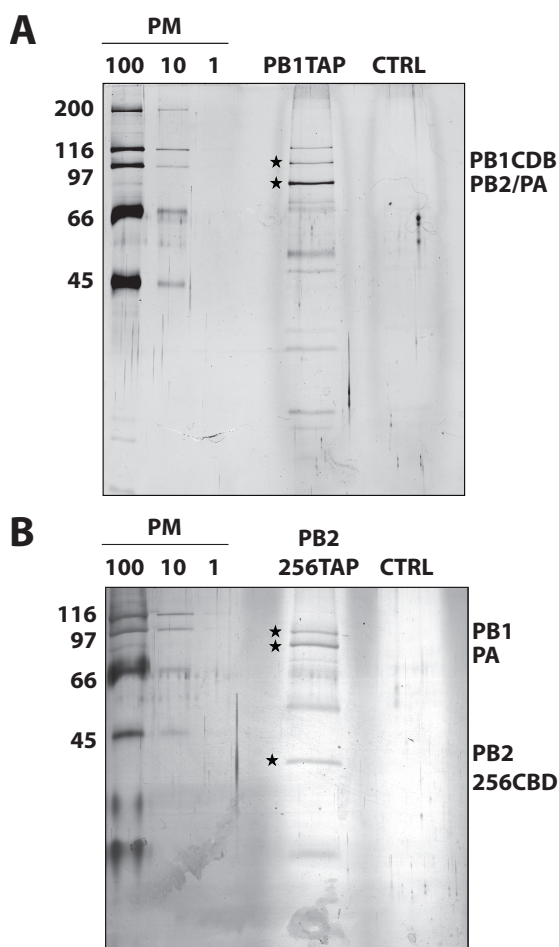
**Figura R3. Ensayo de la actividad biológica de RNPs con la etiqueta TAP.** Se generaron RNPs recombinantes con o sin la etiqueta TAP en la subunidad PB1 mediante la cotransfección de los plásmidos que expresaban las proteínas PB1TAP o PB1, PB2, PA, NP y el genoma pseudo-viral en polaridad negativa que contenía el cDNA de la enzima CAT. Tras 24 horas de incubación se recogieron los cultivos y se analizó la acumulación de la enzima CAT mediante un ensayo de ELISA. Los resultados presentados son la media y desviación estándar de tres ensayos independientes. Como control negativo (CTRL) se omitió el plásmido de expresión de PB1 en la transfección.



**Figura R4. Expresión y purificación de complejos de polimerasa PB2-256TAP.** La línea celular humana HEK-293T se co-transfectó con los plásmidos que contenían el cDNA de las subunidades PB1, PB2-256TAP ó PB2 y PA tras su infección con el virus recombinante vTF7-3. A las 16 horas post-transfección se recogieron los extractos, se purificaron los complejos y se analizó la purificación mediante WB con anticuerpos específicos para cada una de las subunidades. Las fracciones de la purificación analizada son las siguientes: extracto total (ET), material no pegado a la resina de IgG (NP), retenido en la resina de IgG (PG), material eluido mediante la digestión de la etiqueta por la proteasa TEV (CT), material no cortado por TEV (NC), material no retenido en la resina de calmodulina-agarosa (NR), eluciones sucesivas de la resina de calmodulina (E1-7) y material no eluido de calmodulina (NE). El complejo analizado se muestra a la izquierda de la figura y la posición de las proteínas detectadas a la derecha. La movilidad de los marcadores de tamaño (en kDa) se indica a la izquierda.



**Figura R5. Expresión y purificación de complejos de polimerasa PB1TAP.** Se expresó y se purificó el complejo de polimerasa PB1TAP o su correspondiente control negativo como se ha descrito en la Figura R4. Las fracciones de la purificación analizada son las siguientes: extracto total (ET), material no pegado a la resina de IgG (NP), retenido en la resina de IgG (PG), material eluido mediante la digestión de la etiqueta por la proteasa TEV (CT), material no cortado por TEV (NC), material no retenido en la resina de calmodulina-agarosa (NR), eluciones de la resina de calmodulina (E1-7) y material no eluido de calmodulina (NE). El complejo analizado se muestra a la izquierda de la figura y la posición de las proteínas detectadas a la derecha. El complejo analizado se muestra a la izquierda de la figura y la posición de las proteínas detectadas a la derecha. La movilidad de los marcadores de tamaño (en kDa) se indica a la izquierda.



**Figura R6. Análisis de los complejos de polimerasa viral purificados.** Parte del material purificado se separó en geles de poliacrilamida-SDS y se realizó una tinción con plata. Las posiciones de las subunidades del complejo polimerasa PB1TAP (A) y del complejo PB2-256TAP (B) se han indicado a la derecha. Se han incluido los marcadores de peso molecular (PM)(100, 10 y 1 ng por banda).

con la polimerasa PB2-256TAP. Puede apreciarse el cambio de movilidad de la subunidad PB2-256TAP después del corte de la etiqueta con la proteasa TEV, ya que el producto que se obtiene es PB2-256CBD (Figura R4: comparar carril PG con CT o E). La co-elución de las tres subunidades en el último paso de la cromatografía (carriles E1-7 de la Figura R4) demostró que el complejo de la polimerasa se expresaba y se purificaba correctamente. Se obtuvieron resultados muy similares con el complejo con PB1TAP, como se muestra en la Figura R5.

en PB2 no es capaz de sintetizar el RNA. Sin embargo, la estructura tridimensional del mutante es muy similar a la de la polimerasa silvestre y mantiene la capacidad de unir el molde viral de RNA (Torreira, 2006). La principal ventaja que ofrecía la reconstitución del complejo de polimerasa PB2-256TAP era que se expresaba en grandes cantidades y, como se verá más adelante, la concentración de complejo purificado resultó ser un punto limitante en nuestro abordaje. Como control negativo se expresó y purificó una polimerasa silvestre sin ninguna etiqueta. La purificación por TAP se siguió a lo largo de todos los pasos mediante WB con anticuerpos específicos para cada una de las tres subunidades. En la Figura R4 se muestran los resultados obtenidos

El material purificado se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y tinción con plata para determinar tanto la concentración de proteína como su pureza (Figura R6). Las bandas correspondientes a las tres subunidades de la polimerasa eran evidentes (PB1-CBD, PB2 y PA en la Figura R6-A o PB1, PB2-256CBD y PA en la Figura R6-B). Hay que destacar que la relación molar entre las tres subunidades de la polimerasa era 1:1:1, lo cual estaría de acuerdo con la naturaleza trimérica del complejo. La mayor parte de las bandas que aparecían en el material purificado no estaban presentes en los controles negativos, lo que nos sugería que podría tratarse de factores asociados específicamente a la polimerasa viral recombinante.

**Tabla R1. Identificación de las subunidades de la polimerasa viral**

Nº de acceso *	Proteína	MT	NMB	NME	%CS	MASCOT	P-valor
gi 3721960	PA polymerase subunit (IAV H3N2)	83637	21	13	19	108	3.3e-0.05
gi 324942	Polymerase basic 1 PB1 (IAV H2N2)	86958	22	18	20	166	9.6e-11
gi 40795579	Polymerase 2 PB2 (IAV H5N2)	26119	10	7	32	83	0.0015

**Tabla R2. Identificación de factores asociados polimerasa viral**

Nº de acceso *	Proteína	MT	NMB	NME	%CS	MASCOT	P-valor
gi 1469195	KIAA0136 (NXP2)	109488	11	8	10	83	0.0006
gi 38014635	PSF/SFPQ	76255	22	9	14	68	0.025
gi 13514817	DEAD/H box polypeptide 3 (DDX3)	736255	22	11	19	99	0.0003
gi 14141154	HNRNP-M	73430	22	12	21	91	0.0018
gi 15022507	Coactivator Activator (CoAA/RBM14)	69634	30	9	17	70	0.014
gi 226021	Growth regulated nuclear 68 protein (DDX5)	67394	20	14	26	198	3.9e-014
gi 18088719	Beta 5-tubulin	50096	36	15	23	104	1.1e-005
gi 48145673	HNRNP-H1	49384	34	14	37	142	1.5e-008
gi 306553	Ribosomal protein small subunit S3	30208	13	8	24	90	0.00014
gi 51767781	Similar to Zinc finger protein 71	19010	19	7	39	90	0.0026

MT: masa molecular teórica, NMB: número de masas buscadas, NME: número de masas encontradas, %CS: cobertura de secuencia, MASCOT: puntuación MASCOT.

### 1.1.2 Identificación de factores celulares asociados a la polimerasa viral

La identificación de proteínas asociadas a la polimerasa viral recombinante se llevó a cabo mediante espectrometría de masas de fragmentos tripticos (MALDI-TOF). Se abordó primero la identificación de factores celulares asociados a la polimerasa PB1TAP por ser una enzima totalmente funcional. Tras múltiples intentos de mejorar el rendimiento de la purificación, no se llegó en ningún caso a los límites de sensibilidad que la técnica de MALDI-TOF requería. Se decidió entonces partir de los complejos de polimerasa PB2-256TAP. Se obtuvo un mayor rendimiento de la purificación debido a la mayor solubilidad

del complejo mutante. El patrón de bandas observado en ambos complejos era muy similar (comparar carriles PB1TAP y PB2-256TAP de la Figura R6), por tanto no se esperaba perder mucha información en el análisis con la polimerasa PB2-256TAP.

Tras la purificación por TAP de los complejos PB2-256TAP la mayor parte del material se separó en un gel de poliacrilamida-SDS y se realizó una tinción con PageBlue. Se recortaron las bandas manualmente, se digirieron con tripsina de manera individual y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. En la Tabla R1 se muestran los parámetros de la identificación de las tres subunidades de la polimerasa, todas con

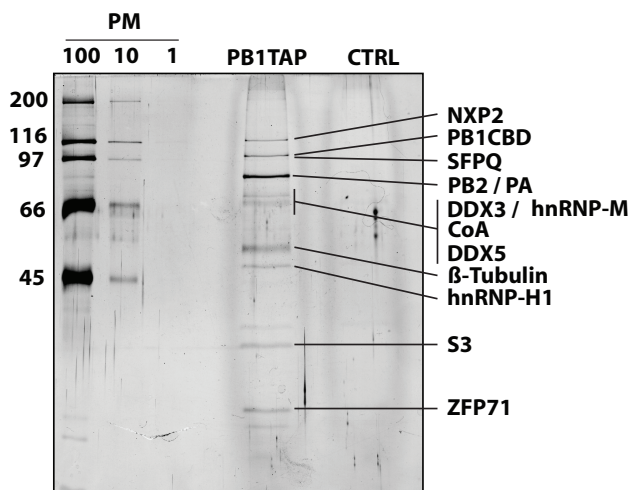


Figura R7. Proteínas identificadas asociadas a la polimerasa viral. Asignación de las proteínas identificadas asociadas al complejo de polimerasa viral.

un buen índice de probabilidad MASCOT. La mejor identificación para el mutante de delección de PB2 correspondía a un fragmento N-terminal de la proteína PB2, ya que el índice MASCOT frente a la subunidad entera era mucho menor. En la Tabla R2 se muestran las identificaciones de las proteínas celulares asociadas a la polimerasa viral. No fue posible identificar todas las bandas recortadas del gel, pero las presentadas en la Tabla tenían un índice MASCOT significativo con un valor  $p < 0,02$ .

La espectrometría de masas MALDI-TOF proporciona una huella peptídica de cada proteína mediante la cual se identifican los factores, pero no se analiza la secuencia aminoacídica de los péptidos. Por ello se realizó una primera selección de las proteínas identificadas en base a la correlación entre su masa teórica y la movilidad de las bandas en el gel. Como se muestra en la Figura R7, la mayoría de factores presentaron masas compatibles excepto algunas proteínas que no han sido incluidas en la Tabla R2. La proteína SFPQ tiene una naturaleza básica que altera la correcta movilidad en geles de poliacrilamida-SDS, por tanto no fue descartada. De este modo se identificaron como factores asociados a la polimerasa viral las proteínas NXP2, SFPQ, DDX3, hnRNP M1-4, *Activador-Coactivador*,

DDX5, β5-tubulina, hnRNP H1, la subunidad S3 del ribosoma, y la proteína *similar to zinc finger 71*. La mayor parte de estas proteínas tienen dominios de unión a RNA y están implicadas en algún paso del metabolismo del RNA celular como se comentará en la Discusión.

Para validar los resultados obtenidos por espectrometría de masas se expresaron y purificaron de nuevo los complejos de polimerasa TAP y se verificó la presencia de los factores celulares mediante WB con anticuerpos específicos de cada proteína. No se realizó esta aproximación con todas las proteínas porque en aquel momento no se disponía de todos los anticuerpos necesarios. Se realizó una purificación por TAP únicamente hasta la elución de la resina de IgG con el corte de la etiqueta TAP con la proteasa TEV porque un solo paso de cromatografía fue suficiente para ver enriquecimiento o aparición de una proteína en el material purificado. Además, se redujo notablemente el número de células necesarias para llevar a cabo el análisis. Los resultados mostraron que en todos los casos fue posible detectar una copurificación de las proteínas identificadas tanto con el complejo polimerasa 256TAP como con el silvestre PB1TAP (Figura R8). La menor cantidad de proteína detectada asociada al complejo PB1TAP fue debido a su menor rendimiento



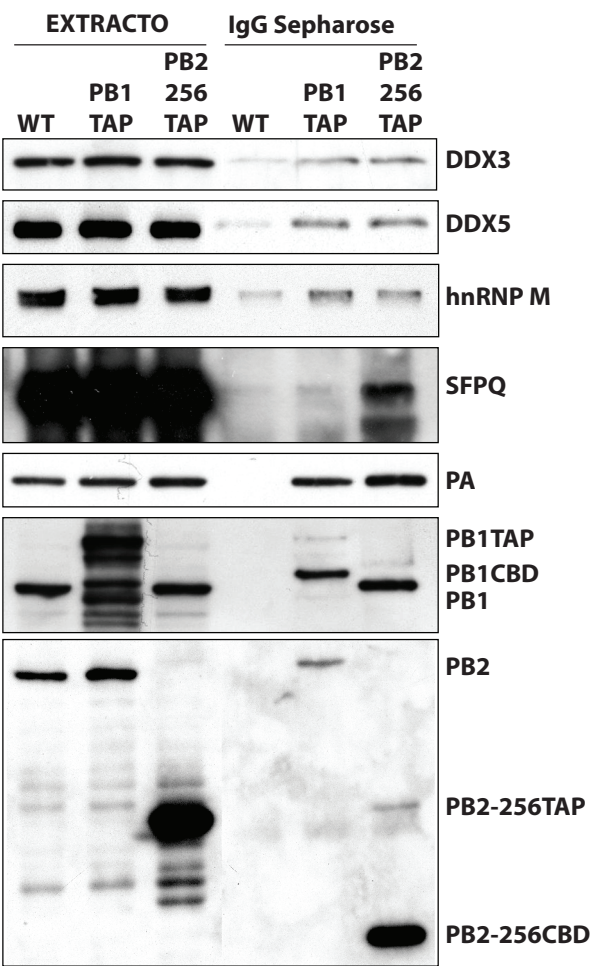


Figura R8. Verificación de las identificaciones de las proteínas asociadas a la polimerasa viral mediante WB. Se expresaron nuevos complejos polimerasa PB1TAP, PB2-256TAP y WT, se purificaron mediante el protocolo TAP hasta la elución de la resina de IgG con la proteasa TEV. Se analizaron tanto el material eluido (IgG Sepharose) y como el extracto total mediante WB con anticuerpos específicos de las tres subunidades de la polimerasa y de los distintos factores asociados. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha.

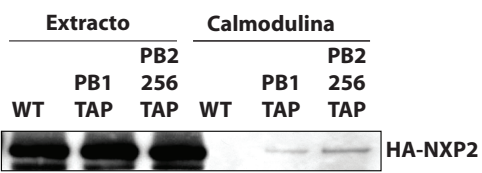


Figura R9. Verificación de la interacción del factor HA-NXP2 con la polimerasa viral mediante WB. Se co-expresaron los complejos polimerasa PB1TAP, PB2-256TAP y WT con la proteína HA-NXP2, se purificaron mediante el protocolo TAP y se analizó la presencia del factor HA-NXP2 mediante WB con un anticuerpo específico de la etiqueta HA.

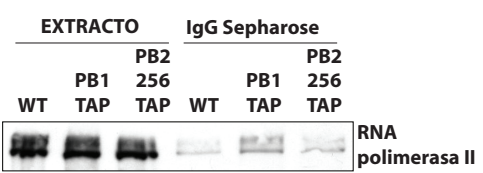
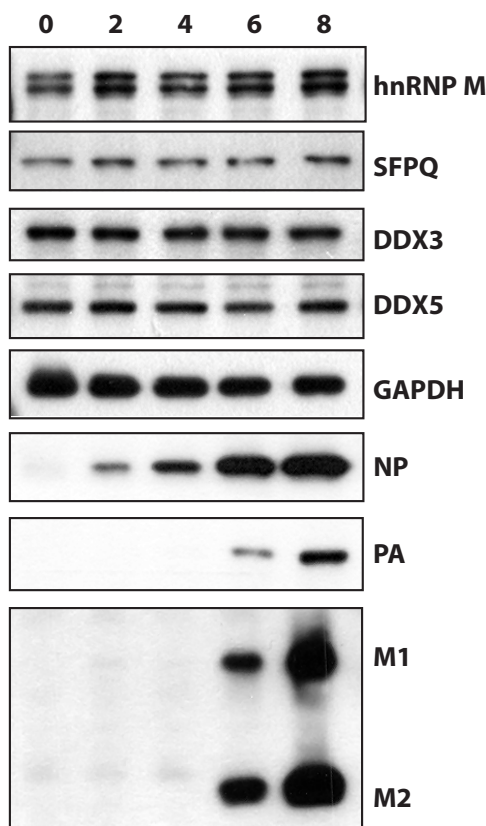


Figura R10. Verificación de la interacción de la RNA polimerasa II celular con la polimerasa viral mediante WB. Se expresaron los complejos polimerasa PB1TAP, PB2-256TAP y WT, se purificaron y se analizaron como se explica en la Figura R8.

en la purificación por TAP. Uno de los factores de los que no se disponía de anticuerpos específicos fue NXP2, una proteína de matriz nuclear. Era de gran interés para nosotros

porque trabajos anteriores demostraron que la replicación del virus de la gripe tenía lugar en este compartimento nuclear (López-Turiso et al, 1990). Por este motivo se clonó el gen de la proteína NXP2 en un vector de expresión



**Figura R11. Cinética de acumulación de los factores celulares en cultivos infectados con el virus de la gripe.** Se infectaron cultivos de células A549 con la cepa WSN del virus de la gripe a alta mdi (5 ufp/ml). A los tiempos post-infección indicados se recogieron los extractos y se analizó la acumulación de las proteínas celulares (hnRNP M, SFPQ, DDX3, DDX5 y GAPDH) y virales (NP, PA, M1 y M2) mediante WB con anticuerpos específicos. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles.

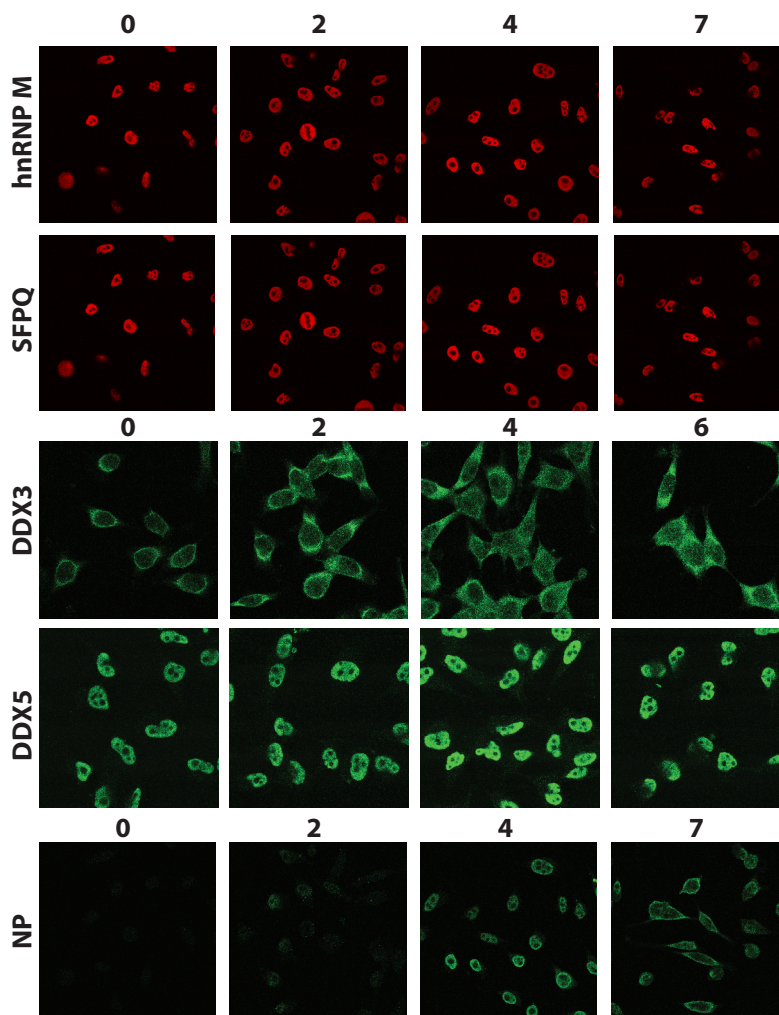
## 1.2 Análisis funcional de los factores celulares asociados a la polimerasa durante la infección viral

### 1.2.1 Análisis de los factores asociados a la polimerasa viral en células infectadas

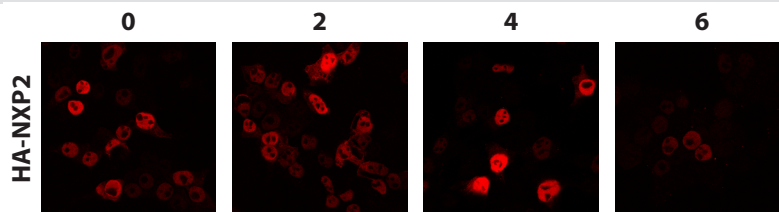
con la etiqueta HA (descrito en el apartado 1.3) y se co-expresó junto con las tres subunidades de la polimerasa viral. Como se muestra en la Figura R9, existía una asociación específica de la proteína HA-NXP2 con los dos complejos recombinantes de polimerasa tras la purificación por TAP. Durante la realización de este trabajo se describió la asociación de la RNAPII con el complejo de polimerasa PB1TAP (Engelhardt et al, 2005). Por tanto se llevó en paralelo el análisis de este factor celular como control positivo y, tal y como se esperaba, se detectó su presencia en el material purificado (Figura R10). Hay que destacar que la RNAPII no se asocia a la polimerasa viral cuando ésta carece del dominio C-terminal de la subunidad PB2.

Con los resultados obtenidos se decidió caracterizar la asociación de los factores DDX3, DDX5, hnRNP M, SFPQ y NXP2 con la polimerasa durante la infección viral.

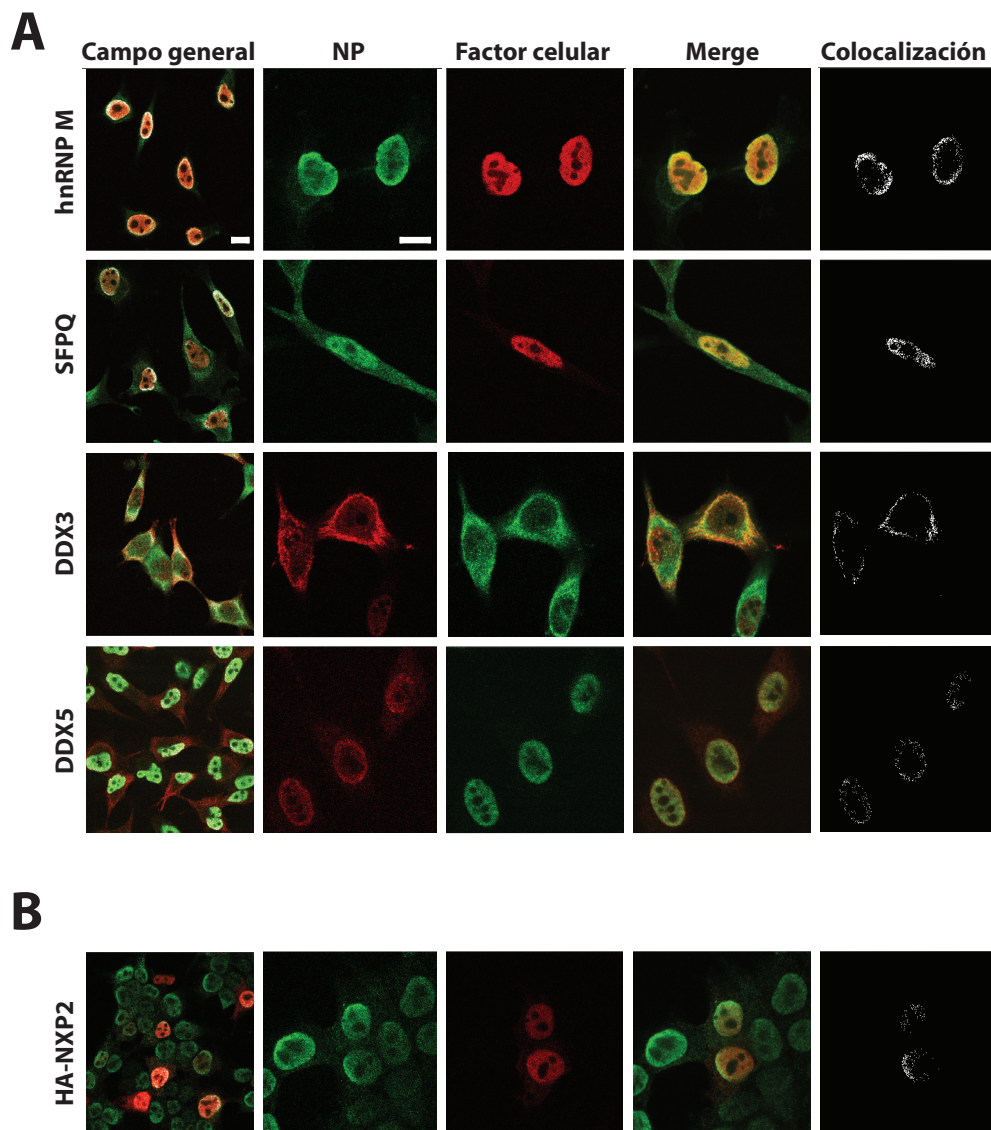
Para determinar la relevancia para la infección de la interacción de los factores identificados con la polimerasa viral, se analizaron los niveles de expresión y la distribución celular de dichas proteínas en células infectadas. Se infectó la línea celular A549 con el virus de la gripe a alta multiplicidad de infección (mdi). Se analizó la acumulación de las proteínas celulares mediante WB con anticuerpos específicos (Figura R11). No se alteraron los niveles de expresión de ninguna de las proteínas como consecuencia de la infección. A continuación se estudió la localización celular de estos factores durante la infección. Para ello se realizó un análisis por inmunofluorescencia en células HeLa infectadas a alta mdi (Figura R12). Se realizaron marcajes dobles con anticuerpos específicos para cada uno de los factores celulares y para NP como marcador de la polimerasa presente en la RNP. Las proteínas hnRNP M, SFPQ y DDX5 no cambiaron su localización nuclear, así como tampoco se vio alterada la distribución citoplasmática de DDX3. La proteína NXP2 se analizó tras una transfección de su cDNA



**Figura R12. Localización de los factores celulares asociados a la polimerasa viral en cultivos celulares infectados con el virus de la gripe.** Cultivos de células HeLa se infectaron a alta mdi (5 ufp/ml) con la cepa WSN de gripe y se fijaron a los tiempos post-infección indicados. Se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos de las proteínas celulares y de NP como factor viral. Sin embargo, para la mejor visualización de las imágenes se muestra únicamente la localización de los factores celulares. Imágenes representativas de la localización de NP durante la infección se muestran en los paneles inferiores. Las muestras se analizaron por microscopía confocal y se tomaron secciones ópticas cada 0,2-0,3  $\mu$ m. A la izquierda se indica el factor celular analizado.



**Figura R13. Localización del factor HA-NXP2 en cultivos celulares infectados con el virus de la gripe.** Se expresó la proteína HA-NXP2 24 horas antes de la infección en cultivos de células HEK-293T. Se infectaron a alta mdi con la cepa WSN de gripe y se fijaron a los tiempos post-infección indicados. Se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos de la etiqueta HA y de NP como factor viral y las muestras se analizaron por microscopía confocal. Sin embargo, para la mejor visualización de las imágenes se muestra únicamente la localización del factor NXP2.



**Figura FR14. Colocalización de los factores celulares asociados a la polimerasa viral con las RNPs del virus de la gripe.** Cultivos de células HeLa (A) o HEK-293T (B) se infectaron a alta mdi con la cepa WSN de gripe y se fijaron a los tiempos post-infección indicados. Se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos de las proteínas celulares y de NP como factor viral. A la izquierda de los paneles se indica el factor celular analizado. Del análisis de cada factor celular se muestran cinco paneles: i) un campo general con el análisis de cada proteína celular y NP así como también la señal de colocalización (blanco), ii) imágenes tomadas a mayor aumento donde se muestra la señal de NP, la del factor celular, la superposición de ambas señales (merge) y la señal de colocalización (blanco). Todas las imágenes son secciones ópticas tomadas mediante microscopía confocal.

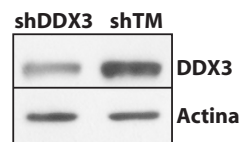


ya que no disponíamos de los anticuerpos necesarios (Figura R13). En el caso de HA-NXP2 tampoco se observó ningún cambio en su localización nuclear durante la infección. Sin embargo, todos los factores colocalizaron con las RNPs virales en algún momento de la infección (Figura R14). Los factores nucleares SFPQ, hnRNPM, DDX5 y HA-NXP2 colocalizaron con las RNPs en el núcleo a las 4 horas post-infección (hpi), momento en el cual los procesos de replicación y transcripción viral alcanzan su máxima actividad. En este punto de la infección la proteína NP se encuentra distribuida por todo el núcleo, con mayor concentración en la periferia donde se observa una mayor colocalización (Figura R14, columna de colocalización). Se observó una colocalización de la proteína citoplasmática DDX3 con NP en el citosol a tiempos más tardíos de la infección, cuando las RNPs son exportadas del núcleo. Estos resultados mostraron que los factores identificados por espectrometría de masas asociados a la polimerasa viral también se asocian a las RNPs durante la infección viral.

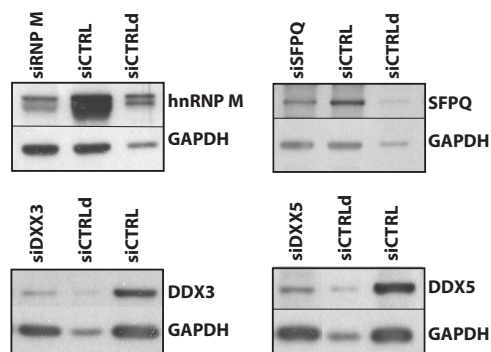
### 1.2.2 Silenciamiento génico de los factores celulares asociados al complejo viral

Se ha descrito en los resultados anteriores que las proteínas hnRNPM, SFPQ, DDX3, DDX5 y HA-NXP2 colocalizan con las RNPs durante la infección viral, de modo que podrían estar implicados en replicación, transcripción, transporte o maduración de los RNAs virales. Para poder estudiar estas posibilidades se llevó a cabo el silenciamiento génico de los factores asociados a la polimerasa viral. Se abordaron distintas estrategias para el silenciamiento de los distintos genes celulares.

En primer lugar se utilizaron shRNA (*short hairpin RNA*) expresados por los plásmidos pSuperRetro-puromicina (pSRpuro). Los shRNAs son secuencias de unos 60 nucleótidos que una vez expresadas son procesadas por la



**Figura F15. Silenciamiento de la expresión génica de la proteína DDX3 mediante shRNAs.** Se transfeció la línea celular HEK-293T con los plásmidos pSRpuro-DDX3 y pSRpuroTM. Tras 48 horas se seleccionaron las células transfectadas mediante la incorporación del antibiótico puromicina (2µg/ml) al medio de cultivo. A las 96 horas post-transfección se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de las proteínas DDX3 y actina (como control de carga) mediante WB con anticuerpos específicos. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles.



**Figura R16. Silenciamiento de la expresión génica de las proteínas hnRNPM, SFPQ, DDX3 o DDX5 mediante siRNAs.** Se transfeció la línea celular A549 con siRNAs (100nM) correspondientes a cada factor. Tras 24 horas se transfectaron de nuevo las células (siRNA 100nM). A las 72 horas post-transfección se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de las proteínas hnRNPM, SFPQ, DDX3 y DDX5 mediante WB con anticuerpos específicos. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles. Como control negativo se utilizó una secuencia de siRNA irrelevante y se analizó la misma cantidad de extracto que en el caso del factor celular y una dilución de un décimo para controlar el límite de sensibilidad de los distintos anticuerpos (siCTRLd). Como control de carga se analizó la proteína celular GAPDH.

célula y se generan los siRNA (*small o short interfering RNA*) funcionales de 19 pares de bases. Estos plásmidos contienen el cDNA del gen PAC, enzima que confiere resistencia al antibiótico puromicina. Se generaron plásmidos pRSpuro con las secuencias de silenciamiento para DDX3, DDX5, hnRNPM y SFPQ (apartado 1.4 Materiales y Métodos). Tras la transfección de los plásmidos y la selección con el antibiótico se analizó la eficacia de silenciamiento mediante WB con anticuerpos específicos. La acumulación de las proteínas DDX5, hnRNPM y SFPQ se redujo en torno a un 20-40% (datos no mostrados). Sin embargo, la eficacia de silenciamiento del gen de DDX3 fue del 60-80%, (Figura R15). Se utilizó una secuencia de *T. maritima* como control negativo.

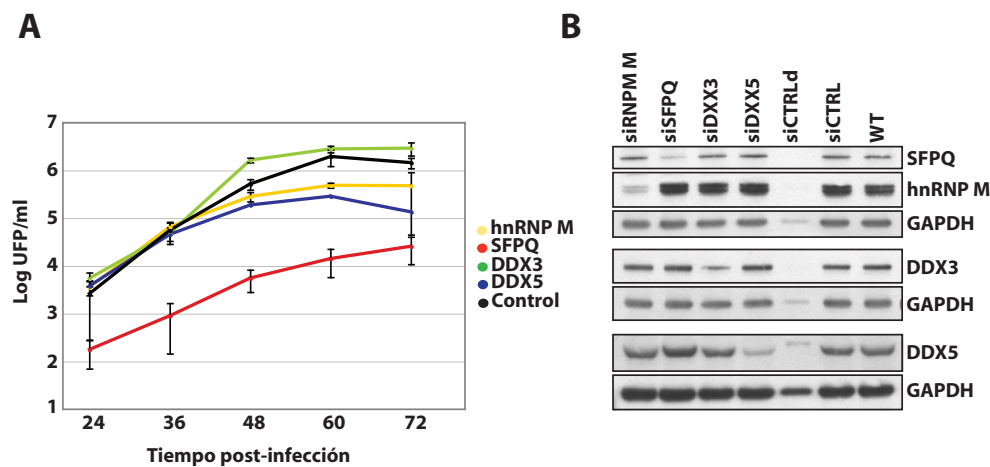
Con la intención de obtener un buen silenciamiento génico de los factores DDX5, hnRNP y SFPQ se utilizó el sistema MISSION shRNA de Sigma ya que disponía de una

genoteca de silenciadores. En este caso tampoco se consiguió un silenciamiento génico superior al 50% (datos no mostrados).

Finalmente se utilizaron siRNAs. Se transfectaron las células directamente con los siRNAs y se analizó el rendimiento del silenciamiento mediante WB. En todos los casos se logró un silenciamiento génico superior al 70-90% (Figura R16). Como control negativo se utilizó una secuencia de RNA irrelevante. Este procedimiento de silenciamiento fue reproducible con todos los siRNAs utilizados, condición indispensable para la realización de posteriores experimentos.

### 1.2.3 Análisis de la infección viral en células que carecían de distintos factores celulares

El silenciamiento génico fue una aproximación clave que permitió proceder al estudio de la relevancia funcional de la interacción de los factores celulares con la



**Figura R17. Cinética de crecimiento del virus de la gripe en células que carecen de los factores celulares hnRNPM, SFPQ, DDX3 o DDX5.** Se llevó a cabo el silenciamiento génico en la línea celular A549 de los factores hnRNPM, SFPQ, DDX3 o DDX5, como se indica en la Figura R16. A 72 horas post-transfección se infectaron las células a baja mdm con la cepa Vic del virus de la gripe. (A) A los tiempos indicados se recogieron muestras de cada sobrenadante (como se indica en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos) y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa por duplicado. (B) A las 72 horas post-transfección se analizó la acumulación de las distintas proteínas celulares mediante WB con anticuerpos específicos como control del rendimiento del silenciamiento en cada caso. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles. siCTRLd, dilución de un décimo de la muestra siCTRL; WT, células sin tratamiento de silenciamiento.

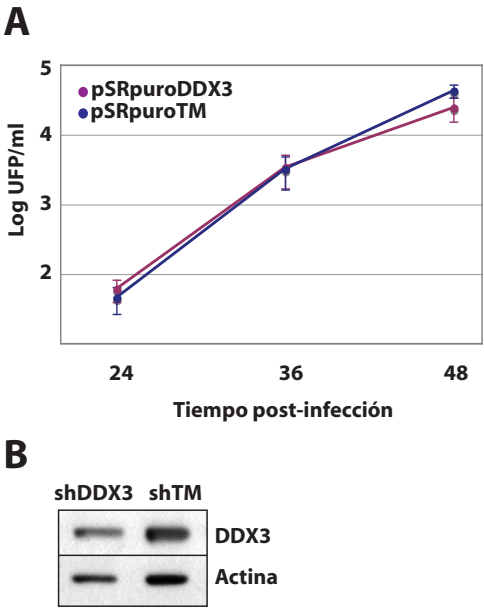
polimerasa del virus. La mayor parte de los experimentos presentados se realizaron en células con proteínas silenciadas mediante siRNAs.

1.2.3.1 Estudio del crecimiento del virus

Se estudió la cinética de crecimiento del virus en células que carecían de los factores SFPQ, hnRNPM, DDX3 o DDX5. Como control negativo se llevó en paralelo el silenciamiento con un siRNA de secuencia irrelevante. Tras 72 horas de silenciamiento se infectaron las células A549 con la cepa Vic de gripe a baja mdi. A distintos tiempos post-infección se recogieron muestras de los sobrenadantes y se analizó su infectividad mediante ensayos de placa. La mayor alteración de la cinética de crecimiento viral se observó en células con el factor SFPQ silenciado (Figura R17-A). El virus presentó una disminución del título viral de entre 1 y 2.5 logaritmos (log) a lo largo de toda la cinética de crecimiento. Sin embargo, la ausencia parcial de los factores DDX5 y hnRNPM solo afectó al virus a partir de las 48 horas, con una disminución máxima del título viral de 1 log. Finalmente, el silenciamiento del factor DDX3 no afectó al título viral. La eficacia del silenciamiento génico de cada proteína se muestra en la Figura R17-B.

El silenciamiento del gen de DDX3 fue aproximadamente del 40-50%, de modo que se realizó el silenciamiento con el sistema de pSRpuro, que para este gen resultó ser más eficaz que con los siRNAs. Tras 96 horas de silenciamiento se infectaron células HEK293T con la cepa WSN de gripe y se analizó el título viral (Figura R18). No se registró ningún descenso del título viral, resultado que no difería del obtenido con el silenciamiento mediante siRNAs.

Estos resultados sugerían que la ausencia del factor SFPQ afectaba en gran medida la infección viral, mientras que la de DDX5



**Figura R18. Cinética de crecimiento del virus de la gripe en células que carecen del factor celular DDX3.** Se llevó a cabo el silenciamiento génico del factor DDX3 en la línea celular HEK-293T como se indica en la Figura R15. A 96 horas post-transfección se infectaron las células a baja mdi con la cepa WSN del virus de la gripe. (A) A los tiempos indicados se recogieron muestras de cada sobrenadante (como se indica en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos) y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa. (B) A las 96 horas post-transfección se analizó también la acumulación de las proteínas celulares mediante WB con anticuerpos específicos como control del silenciamiento. La posición de las proteínas DDX3 y actina se muestra a la derecha de los paneles.

y hnRNPM sólo afectaban ligeramente. La ausencia de DDX3 no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento del virus.

1.2.3.2 Estudio de la acumulación de proteínas virales

Se continuó la caracterización de la infección viral en células carentes de distintos factores mediante el análisis de la acumulación de proteínas virales en un único ciclo de infección. Tras 72 horas de tratamiento con siRNAs, la línea celular A549

se infectó con la cepa Vic de gripe a alta mdi. A distintos tiempos post-infección se analizó la acumulación de proteínas virales mediante WB con anticuerpos específicos (Figura R19). Se analizaron dos proteínas de expresión temprana del virus, PA y NP, y como proteínas de expresión tardía se analizaron M1 y M2. El estudio del segmento M era doblemente interesante ya que para la correcta expresión de una de las dos proteínas que codifica (M2) debía de ocurrir un proceso de *splicing*. La ausencia de las proteínas DDX3 y DDX5 no afectó la correcta expresión y acumulación de las proteínas virales analizadas (Figura R19, comparar los carriles siDDX3 y siDDX5 con sus correspondientes controles negativos siCTRL). La ausencia del factor hnRNP M apenas afectó la acumulación de proteínas virales mientras que la de SFPQ provocó un retraso en la acumulación de aproximadamente 2 horas respecto al control negativo (comparar la presencia de las proteínas PA, NP y M1 a 4, 6 y 8 horas post-infección entre los distintos puntos mencionados en la Figura R19-A). El análisis de los niveles de silenciamiento de las proteínas se muestra en la Figura R19-B. En el punto siSFPQ no se observó la acumulación de la proteína M2. Para discriminar si se trataba de un defecto en el *splicing* del segmento M o bien un problema de sensibilidad del anticuerpo utilizado se analizó 10 veces más cantidad de extracto celular. Como se muestra en la Figura R19-C la relación entre la expresión de las proteínas M1 y M2 no estaba desequilibrada y resultó ser un problema de detección de la proteína M2. Este resultado descartó la posibilidad de que la ausencia del factor SFPQ alterara de algún modo el proceso de *splicing* viral.

#### 1.2.3.3 Estudio de la síntesis de proteínas virales

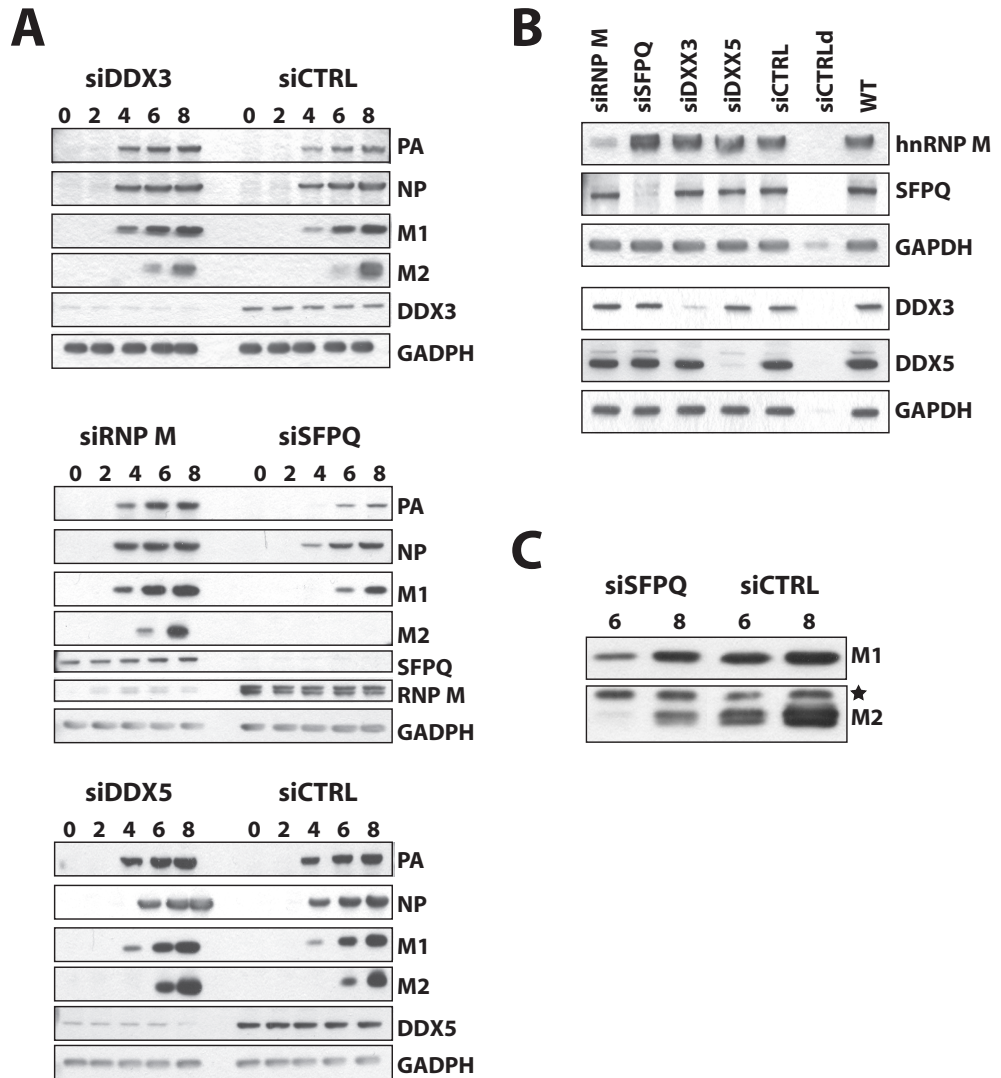
El siguiente paso fue distinguir si el retraso en la infección viral era debida a un defecto en

la síntesis o bien un problema en la estabilidad de las proteínas del virus. Se realizó un experimento paralelo al anterior pero sólo se consideró el silenciamiento de las proteínas SFPQ y hnRNP M, ya que eran los únicos casos que presentaban una disminución en el crecimiento del virus. Tras el silenciamiento y la posterior infección a alta mdi, se analizó la síntesis de proteínas virales (Figura R20). La ausencia de la proteína hnRNP M no afectó la cinética de síntesis de proteínas virales. Sin embargo se observó un claro retraso en la síntesis de proteínas virales en células que carecían del factor SFPQ (comparar carriles de 4 y 6 horas post-infección de los paneles siSFPQ y siCTRL o con células no silenciadas, WT). Además, el retraso en la síntesis fue de aproximadamente 2 horas, el mismo que se observó en la acumulación de proteínas virales. Este resultado junto con los presentados anteriormente sugerían que el factor SFPQ podría estar implicado en un proceso general ya que se observó un retraso en la síntesis y acumulación de proteínas virales de expresión tanto temprana como tardía y de manera independiente a los procesos de *splicing*.

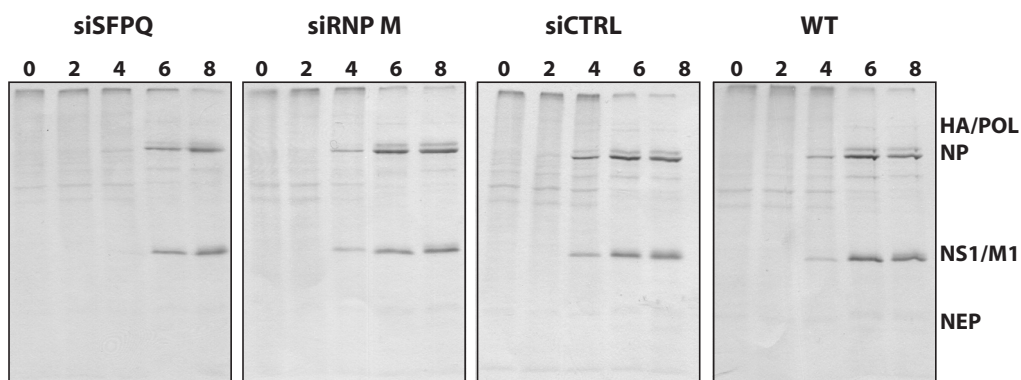
#### 1.2.3.4 Estudio de la localización subcelular de la proteína viral NP durante la infección en células con la proteína SFPQ silenciada

Con el objetivo de esclarecer qué ocurría durante la infección del virus de la gripe en células con el factor SFPQ silenciado se realizó un seguimiento de la proteína NP mediante ensayos de inmunofluorescencia. Como en experimentos anteriores, células tratadas con siRNAs del gen SFPQ se infectaron a alta mdi con el virus Vic. A lo largo de la infección se analizaron las proteínas NP, como marcador de las RNPs virales, y el factor SFPQ con anticuerpos específicos (Figura R21). Los resultados mostraron de nuevo un retraso de entre dos y cuatro horas en la infección en las células carentes de SFPQ. Además se observó





**Figura R19. Cinética de acumulación de proteínas virales en células que carecen de los factores celulares hnRNP M, SFPQ, DDX3 o DDX5.** Se llevó a cabo el silenciamiento génico de los factores hnRNP M, SFPQ, DDX3 o DDX5 en la línea celular A549, como se indica en la Figura R16. A 72 horas post-transfección se infectaron las células a alta mdi con la cepa Vic del virus de la gripe. (A) A los distintos tiempos post-infección indicados se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de distintas proteínas virales (PA, NP, M1 y M2) y celulares mediante WB con anticuerpos específicos. El control de las muestras siRNP M y siSFPQ es el presente en el panel junto a la muestra siDDX5. (B) A las 96 horas post-transfección se analizó también la acumulación de las proteínas celulares mediante WB con anticuerpos específicos como control del silenciamiento. (C) Se analizó diez veces más cantidad de extracto de las muestras siSFPQ y siCTRL a 6 y 8 horas post-infección y se analizó la acumulación de las proteínas virales M1 y M2 mediante WB. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles. El asterisco muestra una banda producto de una reactividad cruzada del anticuerpo.



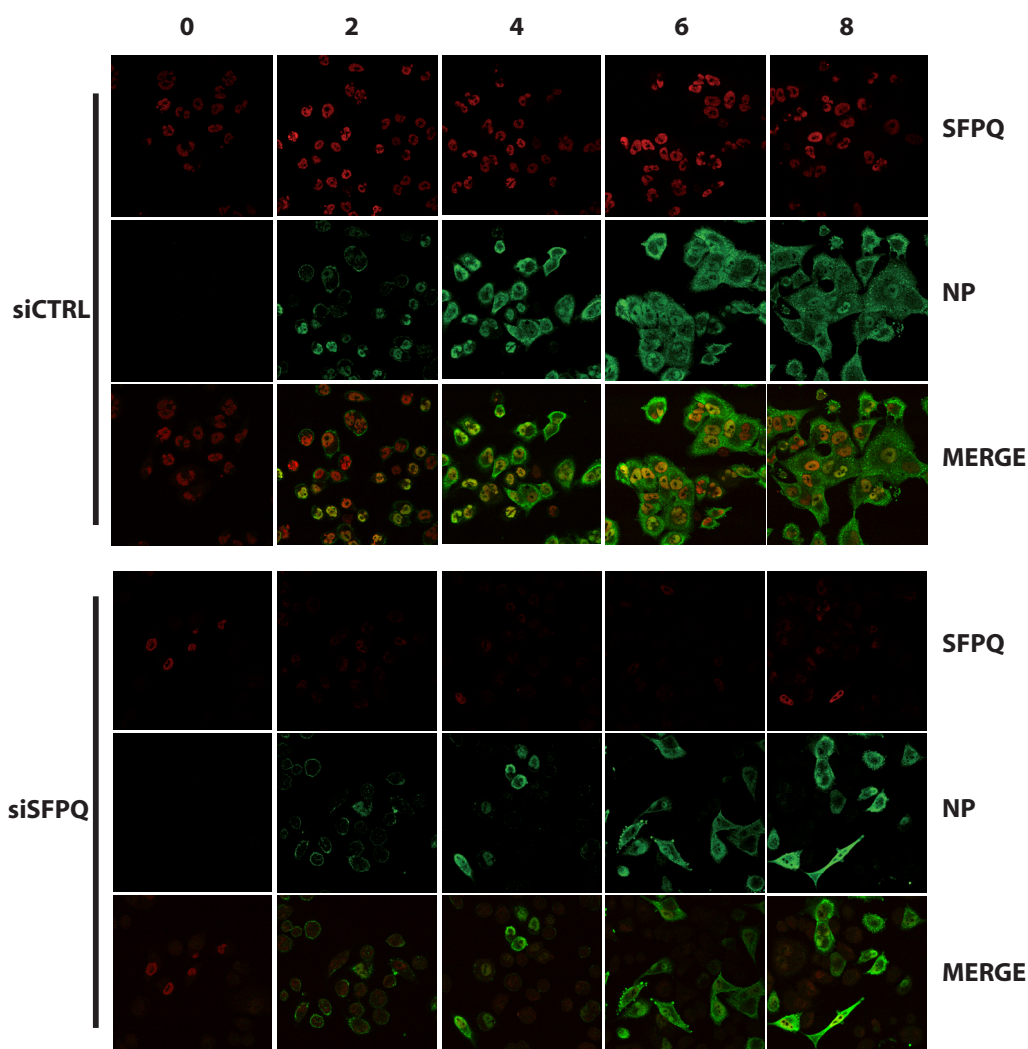
**Figura R20. Cinética de síntesis de proteínas virales en células que carecen de los factores celulares hnRNP M y SFPQ.** Se llevó a cabo el silenciamiento génico de los factores hnRNP M y SFPQ en la línea celular A549, como se indica en la Figura R16. A las 72 horas post-transfección se infectaron las células a alta mdi con la cepa WSN del virus de la gripe. A los tiempos indicados se realizó un marcaje metabólico con  $^{35}\text{S}$  Met-Cys (descrito en apartado 6.1 de Materiales y Métodos) y se llevó a cabo una deglicosilación del extracto (descrito en apartado 6.2 de Materiales y Métodos). Se prepararon extractos totales de cada cultivo celular y se analizó la presencia de las principales proteínas virales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y autoradiografía. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles.

un fallo en el inicio de la infección ya que a todos los tiempos post-infección la mayor parte de las células no están infectadas (Figura R21, comparar paneles siSFPQ y siCTRL). Sin embargo, en las células carentes de SFPQ que resultaron infectadas se observaron niveles de NP comparables a los aparecían en las células control, aunque con el retraso que se comentaba anteriormente. Se puede concluir que en ausencia de SFPQ está afectado el inicio de la infección, y en aquellas células donde el ciclo infectivo ha progresado se observa un retraso respecto a las células control.

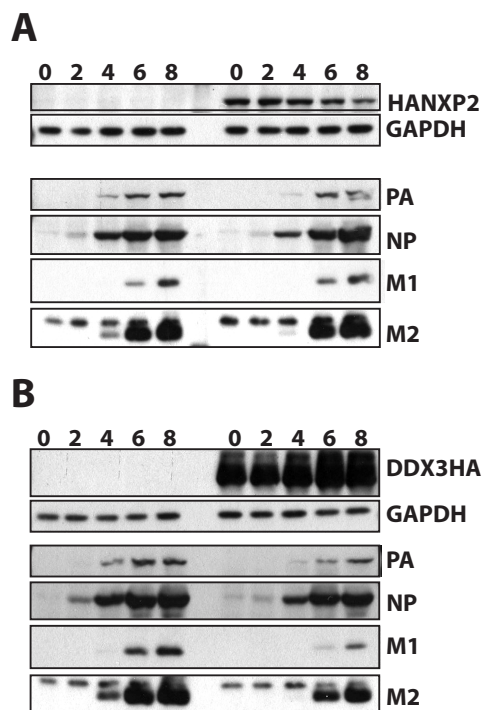
#### 1.2.3.5 Estudio de la acumulación de proteínas virales en células que sobreexpresan los factores HA-NXP2 y DDX3-HA

No fue posible silenciar la expresión del factor NXP2 ya que no se disponía de los anticuerpos necesarios. Por tanto, como alternativa a los ensayos presentados anteriormente se analizó la cinética de infección por acumulación de proteínas virales en células que expresaban HA-NXP2. Como control se llevaron el paralelo infecciones en células que expresaban la

etiqueta HA. Aunque la ausencia de la proteína DDX3 no afectaba al ciclo infectivo del virus, se analizó también la infección en presencia del factor DDX3-HA sobre-expresado. Resultaba interesante estudiar que ocurría en células que sobre-expresaban esta helicasa, ya que DDX3 es un factor que reprime la traducción dependiente de estructuras *cap* (Shih et al, 2008). Tras la sobre-expresión de cada uno de estos factores se infectaron células con el virus WSN a alta mdi y se analizó la acumulación de proteínas virales mediante WB con anticuerpos específicos (Figura R22). La sobre-expresión del factor HA-NXP2 no alteró la cinética de acumulación de proteínas virales. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de la proteína DDX3-HA la expresión de las proteínas PA, M1 y M2 disminuyó respecto al control negativo, mientras que la expresión de NP resultó inalterada. Por tanto, estos resultados sugerían que el factor DDX3 podría estar implicado en la expresión de proteínas del virus.



**Figura R21. Cinética de localización de las RNPs durante la infección en células que carecen de la proteína SFPQ.** Se llevó a cabo el silenciamiento génico de lo factor SFPQ en la línea celular A549, como se indica el la Figura R16. A las 72 horas post-transfección las células se infectaron a alta mdi con la cepa Vic del virus de la gripe y se fijaron a los tiempos post-infección indicados en la parte superior (en horas). Se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos de las proteínas SFPQ y de NP como factor viral, y las muestras se analizaron por microscopía confocal. A la derecha de cada fila de paneles se indica la proteína analizada. También se muestra la superposición de las señales (MERGE).



**Figura R22. Cinética de acumulación de proteínas virales en células que expresan HA-NXP2 o DDX3-HA.**

Se transfectó la línea celular HEK-293T con plásmidos de expresión de las proteínas HA-NXP2 o DDX3-HA, y como control negativo un plásmido que únicamente contenía el cDNA de la etiqueta HA. A las 24 horas post-transfección se infectaron las células a alta mdi con la cepa WSN del virus de la gripe. A los tiempos post-infección indicados se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de distintas proteínas virales (PA, NP, M1 y M2) y celulares (GAPDH) mediante WB con anticuerpos específicos (anticuerpo que reconoce la etiqueta HA para las proteínas HA-NXP2 y DDX3-HA). La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de los paneles.

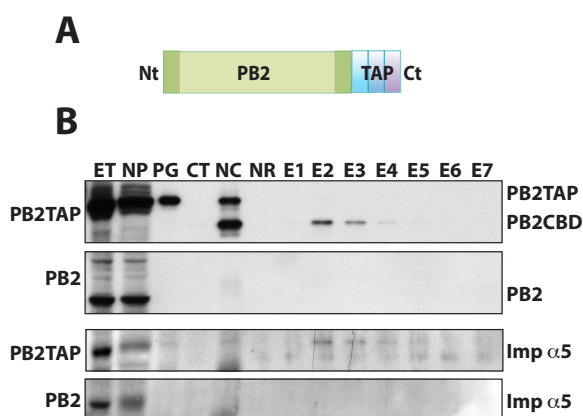
### 1.3.2 Identificación de factores asociados a la proteína PB2

Se analizó la concentración y pureza del material eluido mediante geles de poliácridamida-SDS teñidos con plata (Figura R24). Para la identificación de las bandas que co-purificaban con la proteína PB2, se recortaron del gel y se analizaron mediante espectrometría de masas MS-MS. La espectrometría de masas MS-MS, además de proporcionar una huella peptídica, facilita la secuencia aminoácida de cada péptido, lo que hace que la identificación sea muy fiable. A pesar de ello realizamos una criba de los factores identificados según su relación entre la masa molecular teórica y la movilidad en geles de acrilamida (Figura R25). Además de detectar PB2, se identificaron las proteínas que se presentan en la Tabla R3. De los factores identificados se verificó únicamente la co-purificación de la proteína importina  $\alpha 5$  con PB2TAP ya que parecía ser la más relevante de las obtenidas (Figura R23-B). Existen varias isoformas de importinas  $\alpha$ , de modo que se analizó si la interacción de PB2 con importina  $\alpha 5$  era específica de isoforma o si se trataba de una asociación más general. Se expresó de nuevo la subunidad recombinante PB2TAP y tras el primer paso de purificación se analizó el material eluido mediante WB con anticuerpos

## 1.3 Identificación de factores celulares asociados a la subunidad PB2 de la polimerasa viral

### 1.3.1 Expresión y purificación de la subunidad PB2 recombinante

La identificación de proteínas celulares asociadas a la subunidad PB2 de la RNA polimerasa viral resultaba muy interesante ya que PB2, además de ser esencial para los procesos de replicación y transcripción, se ha descrito como un factor determinante del rango de hospedador. Se expresó en la línea celular humana HEK-293T la subunidad PB2 con la etiqueta TAP fusionada a su extremo C-terminal (Figura R23-A), y como control negativo se expresó la PB2 silvestre. Se purificaron los complejos mediante el método TAP y todo el proceso se siguió por WB con anticuerpos específicos que reconocían la proteína PB2 (Figura R23-B).



**Figura R23. Expresión y purificación de complejos intracelulares formados por PB2TAP.** (A) Diagrama de la subunidad PB2 con la etiqueta TAP fusionada el la parte C-terminal de la proteína. (B) La línea celular humana HEK-293T se transfectó con los plásmidos que contenían el cDNA de la subunidad PB2TAP o PB2 tras su infección con el virus recombinante vTF7-3. Después de 16 horas se recogieron los extractos, se purificaron los complejos y se analizó la purificación mediante WB con anticuerpos específicos para las proteínas PB2 y importina

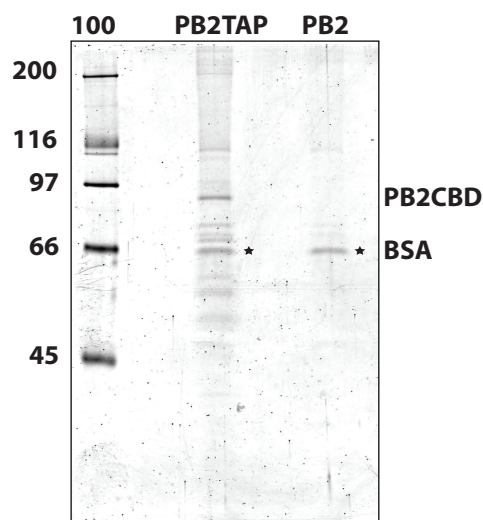
$\alpha$ 5. Las fracciones de la purificación analizada son las siguientes: extracto total (ET), material no pegado a la resina de IgG (NP), retenido en la resina de IgG (PG), material eluido mediante la digestión de la etiqueta por la proteasa TEV (CT), material no cortado por TEV (NC), material no retenido en la resina de calmodulina-agarosa (NR), eluciones sucesivas de la resina de calmodulina (E1-7) y material no eluido de calmodulina (EF). A la izquierda se indica el complejo analizado y a la derecha la posición de las proteínas detectadas.

específicos para las isoformas  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 7 (Figura R26). Los resultados mostraron que las tres isoformas de importina eran capaces de co-purificar con PB2, resultados que estaban de acuerdo con la co-cristalización de la importina  $\alpha$ 5 con el dominio N-terminal de PB2 (Tarendeau et al, 2007) y con la co-localización de PB2 con la importina  $\alpha$ 1 en células infectadas (Gabriel et al, 2008).

### 1.3.3 Análisis de la interacción de las distintas isoformas de importina con la subunidad PB2 de virus humanos y aviares

La subunidad PB2 de la polimerasa es uno de los determinantes virales más relevantes para la adaptación de virus aviares a células humanas. Ha sido descrito que la adaptación de virus aviares a células de ratón implica un cambio en la interacción de PB2 con importina  $\alpha$ 1 (Gabriel et al, 2008). Por tanto se estudió la interacción diferencial de las importinas con virus de distinto origen filogenético. Se expresaron de manera independiente la subunidad PB2 con la etiqueta TAP de un virus aviar (A/Goose/Guandong/1/97 (H5N1)) y la

de dos virus aviares aislados de infecciones esporádicas en humanos (A/Vietnam/1203/04 (H5N1) y A/Thailand/Kan1/04 (H5N1)). Como



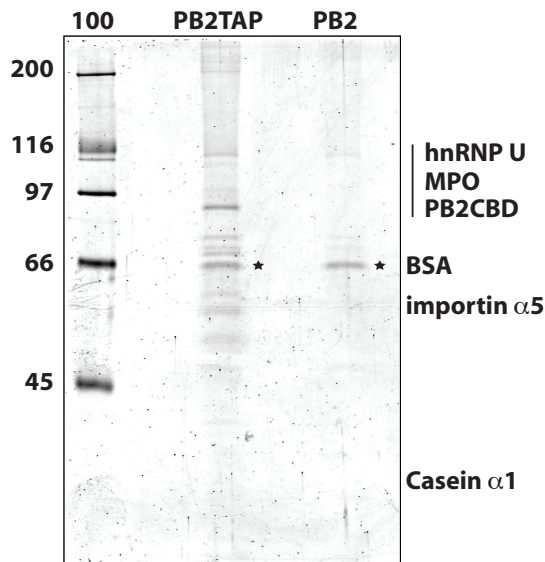
**Figura R24. Análisis de los complejos de PB2TAP purificados.** Parte del material purificado se separó en geles de SDS-PAGE y se realizó una tinción de plata. La posición de la subunidad PB2TAP se indica a la derecha. Con un asterisco se muestra una contaminación de la muestra con BSA. Se han incluido los marcadores de peso molecular (100 ng por banda).



**Tabla R3. Identificación de factores asociados a la subunidad PB2**

Nº de acceso *	Proteína	MT	MASCOT	NPE	%CP	NPF	P-valor
gi 401030	Polymerase basic protein 2 (PB2)	86356	337	10	15	7	1,10e-27
gi 109114641	Predicted Myeloperoxidase	82111	123	8	10	3	3,3e-7
gi 16041796	hnRNP U	80407	100	4	7	2	1,9e-5
gi 60552566	Karyopherin $\alpha$ 1 (importin $\alpha$ 5)	60955	80	5	11	2	0,0019
gi 225632	Casein alpha S1	24447	195	8	42	4	1,7e-13
gi 54300702	Ubiquitin C splice variant	17142	69	1	16	1	0,021

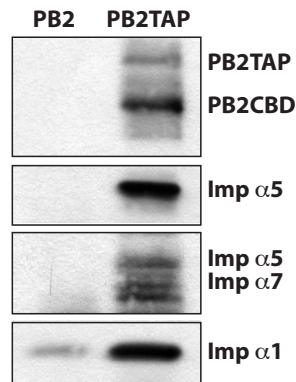
MT: masa molecular teórica, MASCOT: puntuación MASCOT, NPE: número péptidos encontrados, %CP: % cobertura peptídica, NPF: número de péptidos fragmentados.



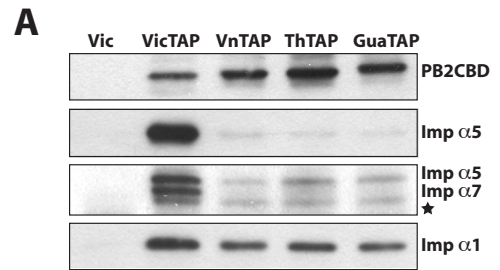
**Figura R25. Proteínas identificadas asociadas a PB2.** Asignación de las proteínas identificadas asociadas a la subunidad PB2 del complejo de polimerasa viral.

control positivo se utilizó la subunidad PB2 del virus humano (A/Victoria/3/75 (H3N2)) utilizado en los ensayos anteriores (Figura R23). Como control negativo se expresó PB2 sin la etiqueta TAP. Se realizó un primer paso de purificación y el material eluido se analizó mediante WB (Figura R27). Los resultados mostraron que la interacción de la subunidad PB2 de cepas aviares fue mucho menor que en el caso de la cepa humana, y que además

era claramente dependiente de la isoforma de las importinas. La interacción de PB2 de origen aviar con las importinas  $\alpha$ 5 y  $\alpha$ 7 fue prácticamente nula, mientras que la asociación con la importina  $\alpha$ 1 disminuyó poco respecto con la cepa humana. Por tanto, los resultados presentados sugerían que la interacción de PB2 con importina  $\alpha$  es dependiente de hospedador.



**Figura R26. Identificación de las distintas isoformas de importina  $\alpha$  asociadas a PB2.** Se expresó de nuevo la subunidad PB2TAP o la versión sin TAP, se purificaron los complejos intracelulares mediante el protocolo TAP hasta la elución de la resina de IgG con la proteasa TEV y se analizó el material eluido mediante WB con anticuerpos específicos para PB2 y para las distintas isoformas de importinas. La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de cada panel.



**B**

	CEPA VIRAL			
	A/Vic (H3N2)	A/Vn (H5N1)	A/Th (H5N1)	A/G/Gua (H5N1)
44	S	A	A	A
64	T	I	I	M
199	S	A	A	A
271	S	T	T	T
475	M	L	L	L
567	N	D	D	D
588	I	A	A	A
627	K	K	E	E
674	T	A	A	A
702	R	K	K	K

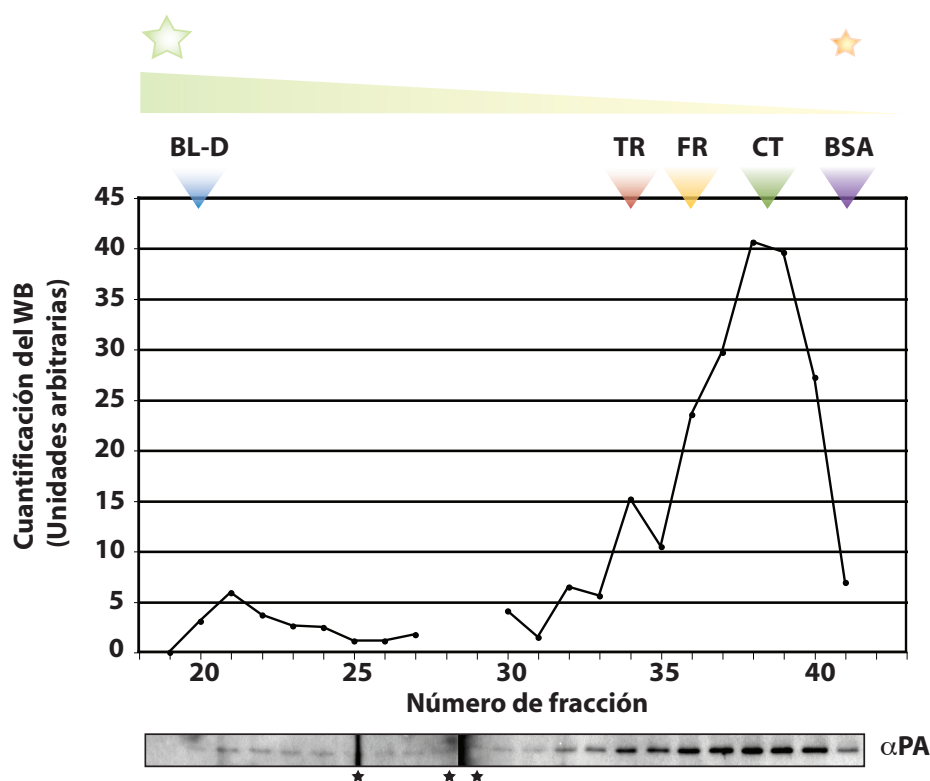
**Figura R27. Asociación de las distintas isoformas de importina  $\alpha$  a la subunidad PB2 de varias cepas virales.** (A) Se expresó la subunidad PB2 de las cepas virales A/Victoria/3/75 (VicTAP), A/Vietnam/1203/04 (VnTAP), A/Thailand/Kan1/04 (ThTAP) y A/Goose/Gaundong/1/97 (GuaTAP) con la etiqueta TAP fusionada en su extremo C-terminal, en la línea celular humana HEK-293T. Como control negativo se expresó la subunidad PB2 de A/Victoria/3/75 (Vic) sin el TAP. La proteína PB2 se purificó mediante la unión a la resina de IgG y se eluyó mediante la digestión de la etiqueta TAP con la proteasa TEV. Se analizó el material eluido mediante WB con anticuerpos específicos para la subunidad PB2 y para las distintas isoformas de importina  $\alpha$ . La posición de las distintas proteínas se muestra a la derecha de la imagen (el asterisco indica la presencia de un contaminante). (B) Comparación de las secuencias de PB2 de las distintas cepas virales utilizadas. En azul se muestran los residuos aminoácidos propios de cepas humanas y en rojo de cepas aviares implicados en la determinación de rango de hospedador.

## 2. ANÁLISIS DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE *IN VIVO*

### 2.1 Caracterización del tamaño de los complejos de polimerasa viral purificados

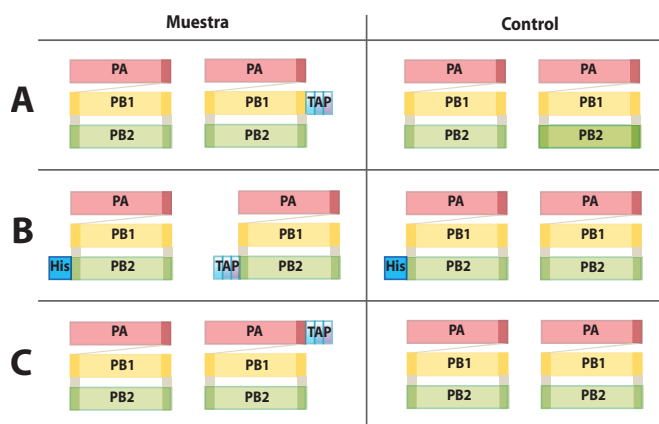
La forma soluble de la polimerasa viral ha sido objeto de varios estudios tanto estructurales como funcionales. Pero hasta el momento no había evidencias de que el complejo fuera capaz de formar oligómeros.

Para estudiar esta posibilidad se expresó y purificó el complejo de la polimerasa con la etiqueta TAP en la subunidad PB1 (como se ha mostrado en el Apartado 1.1.1, Figuras R5 y R6). Tras los dos pasos de purificación del protocolo TAP, el complejo heterotrimérico purificado se analizó por cromatografía de filtración en gel. El tamaño de la polimerasa soluble se determinó mediante la separación de los complejos en una columna Sephacryl-S400, que permite la separación de proteínas globulares de entre 20 a 8000 kDa, y cada fracción se analizó mediante WB con anticuerpos específicos que reconocen la subunidad PA (Figura R28). La columna se



**Figura R28. Análisis por filtración en gel de complejos de polimerasa PB1TAP purificados.** Se analizó la polimerasa PB1TAP purificada por el método TAP en una columna Sephacryl S400. Para determinar el perfil de elución de la polimerasa se analizó una alícuota de cada fracción mediante WB con anticuerpos específicos de PA. En la parte inferior de la figura se muestra el resultado obtenido y en la parte superior la cuantificación del WB. Los asteriscos muestran tres carriles del WB que no se pudieron cuantificar debido a su proximidad al borde del gel o bien por la aparición de una banda vertical artefactual. Se calibró la resina con los marcadores de peso molecular indicados en la parte superior del panel: BL-D, azul dextrano; TR, tiroglobulina (670 kDa); FR, ferritina (440 kDa); CT, catalasa (220 kDa); BSA, seroalbúmina (68 kDa).





**Figura R29. Diagrama de los posibles complejos formados en las células transfectadas.**

La línea celular HEK-293T se co-transfectó con los plásmidos de expresión siguientes: A) PB1TAP+PB1+PB2+PA (o PB1+PB2+PA como control), B) PB1+PB2TAP+PB2His+PA (o PB1+PB2His+PB2+PA como control), C) PB1+PB2+PATAP+PA (o PB1+PB2+PA como control). El diagrama muestra los posibles complejos formados en las células transfectadas.

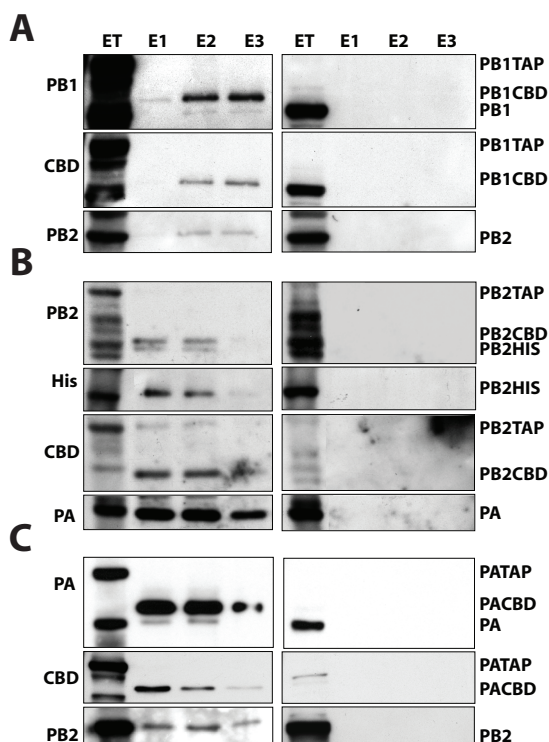
calibró con los siguientes marcadores de peso molecular: azul dextrano, tiroglobulina (MM 670 kDa), ferritina (MM 440 kDa), catalasa (MM 220 kDa) y BSA (MM 68 kDa). La mayor parte de la polimerasa migró con el marcador catalasa (Figura R28, fracciones 38-39) de acuerdo con el tamaño que le correspondía por su naturaleza trimérica (MM 250 kDa). Se obtuvieron resultados similares al analizar las fracciones mediante WB con anticuerpos de PB2 (datos no mostrados). Este resultado mostró que se trataba del complejo de polimerasa con las tres subunidades. Los dímeros PB1-PA y PB1-PB2, que podrían haberse formado en las células transfectadas, no se detectaron en la muestra purificada. Además, la relación molar entre las subunidades PB1, PB2 y PA fue 1:1:1 y no 2:1:1 (Figura R6-A), como sería en caso de formación de dímeros. Se observó que una parte de la muestra tenía un tamaño superior al del complejo heterotrimérico y presentó una movilidad similar a los marcadores ferritina (fracciones 36-37 de la Figura R28) y tiroglobulina (fracción 34 de la Figura R28). Estos resultados sugerían que la polimerasa viral podría formar dímeros (500 kDa) y trímeros (750 kDa) aunque no se puede descartar que el cambio de movilidad pudiera deberse a la asociación con factores celulares. Finalmente, una pequeña fracción de la muestra movió cerca del límite de exclusión de

la columna (fracciones 20-22 de la Figura R28) y podría tener un tamaño dentro del rango de MDa. Por tanto, los resultados presentados sugerían que la polimerasa viral recombinante podría formar oligómeros *in vivo*.

## 2.2 Análisis de los complejos oligoméricos de la polimerasa viral

### 2.2.1 Estudio de la interacción entre complejos de polimerasa viral

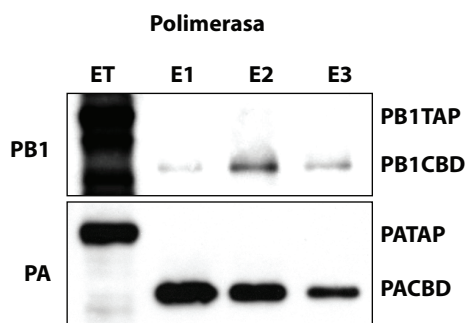
La posible interacción entre dos complejos de polimerasa se analizó mediante la expresión y purificación de complejos cuyas subunidades contenían etiquetas alternativas en la misma posición. El diagrama de la Figura R29 muestra la aproximación experimental utilizada. Se usaron las siguientes subunidades con etiquetas alternativas en ensayos independientes: PB1/PB1TAP, PB2His/PB2TAP y PA/PATAP. Por tanto, la expresión de estas subunidades junto con el resto dio lugar a dos complejos alternativos: **A:** PB1TAP-PB2-PA y PB1-PB2-PA, **B:** PB1-PB2TAP-PA y PB1-PB2His-PA, y **C:** PB1-PB2-PATAP y PB1-PB2-PA (Figura R29, izquierda). Si en cada caso ambos heterotrímeros fueran capaces de interactuar *in vivo*, tras una purificación por TAP las subunidades PB1, PB2His y PA, respectivamente, deberían de resultar co-purificadas. Como controles se



**Figura R30. Análisis de la oligomerización de la polimerasa viral recombinante mediante WB.** Se co-transfectó la línea celular HEK-293T tal y como se describe en la Figura R29. Se prepararon extractos totales y se purificaron los complejos intracelulares de polimerasa recombinante mediante el método TAP. El análisis del material purificado se realizó mediante WB con anticuerpos específicos para cada una de las subunidades de la polimerasa viral (PB1, PB2 y PA) y para las etiquetas utilizadas (CBD y His). A la izquierda de la Figura se muestra el anticuerpo utilizado y a la derecha la posición de cada proteína. ET, extracto total; E1-3, eluciones sucesivas de la resina de calmodulina.

expresaron los complejos WT (PB1-PB2-PA) o con la etiqueta alternativa de histidinas (PB1-PB2His-PA) y se purificaron en paralelo (Figura R29, derecha). Tras la expresión y purificación de los complejos recombinantes, el material eluido se analizó mediante WB con anticuerpos específicos que reconocían las tres subunidades de la polimerasa (PB1, PB2 y PA) y las distintas etiquetas (CBD de PB1CBD, PB2CBD y PACBD, y His de PB2His) (Figura R30). De acuerdo con purificaciones anteriores, no se detectó ninguna banda en los controles negativos (Figura R30, derecha). Sin embargo se observó una clara banda revelada por el anticuerpo que reconocía la cola de

histidinas en las eluciones de la purificación por TAP de los complejos co-expresados que contenían PB2TAP y PB2His (Figura R30-B, izquierda, fila His). Este resultado es consistente con la aparición de una doble banda con el anticuerpo que reconocía la subunidad PB2 (Figura R30-B, izquierda, fila PB2). Una de ellas correspondía a la subunidad PB2His y la otra a PB2CBD (también revelada con el anticuerpo que reconocía la etiqueta CBD, Figura R30-B, izquierda, fila CBD). Para verificar que el material purificado era el complejo heterotrimérico se realizó un WB con anticuerpos específicos que reconocían la subunidad PA (Figura R30-B, izquierda, fila PA).



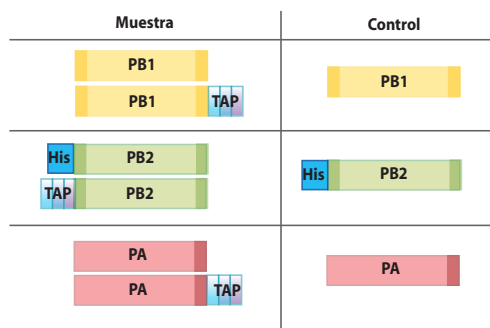
**Figura R31. Control de la posible proteólisis de la polimerasa viral.** La línea celular HEK-293T se co-transfectó con los plásmidos: PB1TAP+PB2+PA o PB1+PB2+PATAP. Se prepararon extractos celulares y se purificaron los complejos intracelulares mediante el método TAP. El análisis del material purificado se analizó mediante WB con anticuerpos específicos para las subunidades PB1 y PA. A la izquierda de la Figura se muestra el anticuerpo utilizado y a la derecha la posición de cada proteína. ET, extracto total; E1-3, eluciones sucesivas de la resina de calmodulina.

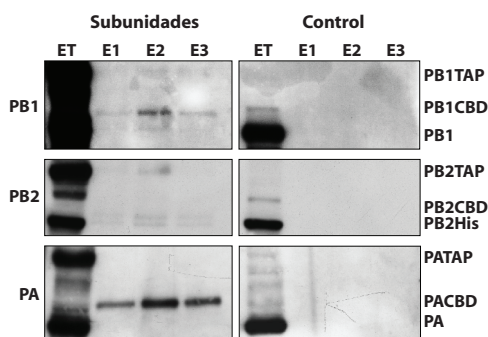
Se obtuvieron resultados similares con la co-expresión de los complejos que contenían las subunidades PB1 y PA con TAP o sin él (Figura R30-A y R30-C respectivamente). El WB con anticuerpos específicos de PB1 y PA reveló la presencia de un doblete en ambos casos (Figura R30-A izquierda, PB1; Figura R30-C, izquierda, PA), y en cada uno de ellos la banda mayoritaria correspondió a PB1CBD y a PACBD. En ambos casos se verificó la presencia del heterotrímero mediante WB con anticuerpos específicos para PB2 (Figura R30-A, izquierda, PB2; Figura R30-C, izquierda, PB2). Para excluir la posibilidad de que los dobletes de proteína detectados en los casos de PB1 y PA fueran producto de una proteólisis, se expresaron únicamente los complejos de polimerasa con PB1TAP y PATAP (Figura R31). En ausencia de las subunidades sin la etiqueta TAP sólo se detectaron las bandas correspondientes a PB1CBD y PACBD. Por tanto, la presencia de complejos de tamaños superiores a 250kDa y la co-purificación de polimerasas con etiquetas alternativas indicaron que la polimerasa del virus de la gripe era capaz de formar oligómeros *in vivo*.

**Figura R32. Diagrama de los posibles complejos formados entre subunidades individuales de la polimerasa.** La línea celular HEK-293T se co-transfectó con los plásmidos de expresión siguientes: A) PB1TAP+PB1 (o PB1 como control), B) PB2TAP+PB2His (o PB2His como control), C) PATAP+PA (o PA como control). El diagrama muestra los posibles complejos formados en las células transfectadas.

## 2.2.2 Estudio de la interacción entre las distintas subunidades de la polimerasa viral

Los resultados presentados en los apartados anteriores no permitieron determinar cual de las subunidades de la polimerasa estaba implicada en la formación de oligómeros. Para ello se expresaron únicamente las parejas de subunidades PB1TAP/PB1, PB2TAP/PB2His y PATAP/PA, como se muestra en el diagrama de la Figura R32. Como control negativo se expresaron las subunidades sin la etiqueta TAP (PB1, PB2His y PA). Tras la purificación por TAP de cada pareja de subunidades se analizó el material eluido mediante WB con anticuerpos específicos que reconocían las tres subunidades (Figura R33). Tanto PB1 como PB2 fueron capaces de interactuar *in vivo* (Figura R33, izquierda, PB1 y PB2). Sin embargo la proteína PA no interactuó consigo misma (Figura R33, izquierda, PA). Estos resultados sugerían que las subunidades PB1 y PB2 podrían estar implicadas en la formación de oligómeros de polimerasa viral, aunque no se





**Figura R33. Análisis de la oligomerización de las subunidades de la polimerasa viral recombinante mediante WB.** Se co-transfectó la línea celular HEK-293T tal y como se describe en la Figura R31. Se prepararon extractos totales y se purificaron los complejos intracelulares formados por cada subunidad mediante el método TAP. El análisis del material purificado se realizó mediante WB con anticuerpos específicos para cada una de las subunidades de la polimerasa viral (PB1, PB2 y PA). A la izquierda de la figura se muestra el anticuerpo utilizado y a la derecha la posición de cada proteína. ET, extracto total; E1-3, eluciones sucesivas de la resina de calmodulina.

puede excluir que dichas interacciones sean mediadas por factores celulares.

### 3. ANÁLISIS GENÉTICO DEL PROCESO DE REPLICACIÓN VIRAL

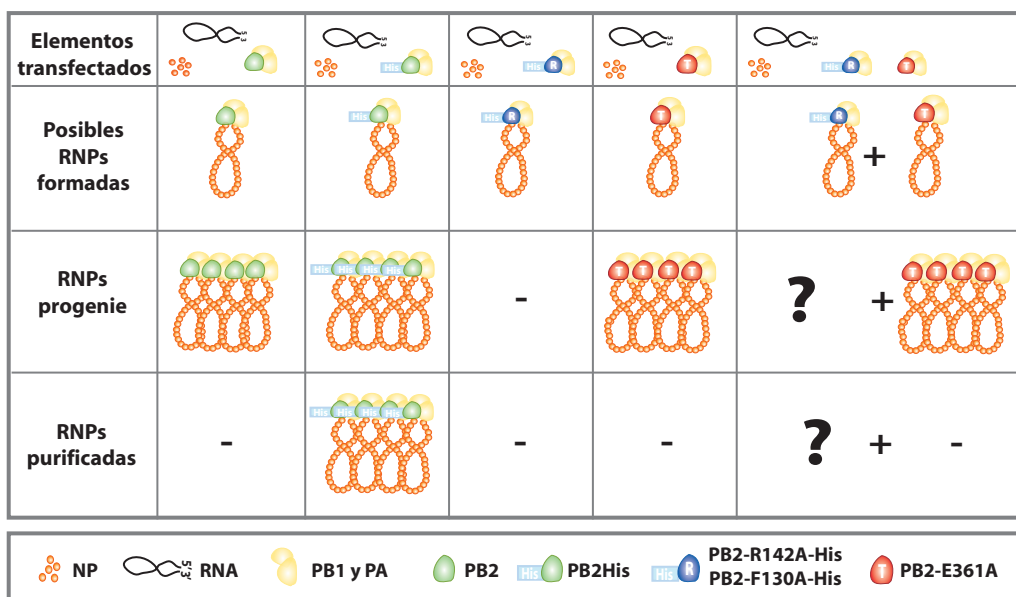
El proceso de replicación del virus de la gripe es llevado a cabo por la RNA polimerasa del virus. Se conocen varios aspectos de este proceso, pero hasta el momento no se sabía si dichos procesos requieren de interacciones entre distintos complejos de la polimerasa viral, como ocurre en otros virus. Los resultados presentados anteriormente indicaron que la polimerasa viral es capaz de formar oligómeros intracelularmente, de modo que el siguiente abordaje que nos planteamos fue analizar qué relevancia podrían tener estas interacciones polimerasa-polimerasa para la correcta replicación del RNA viral.

### 3.1 Diseño experimental

Se diseñó un ensayo de complementación génica en *trans* para analizar los posibles fenómenos de interacción entre complejos de polimerasa viral. El ensayo se basó en un sistema de reconstitución de RNPs *in vivo* que permite analizar los procesos de replicación viral (Mena et al, 1994; Ortega et al, 2000). Este sistema ofrece la posibilidad de analizar separadamente el proceso de replicación del RNA frente al análisis más complejo en el contexto de la infección viral. Además, las RNPs reconstituidas *in vivo* se podían purificar preservando su actividad biológica (Area et al, 2004; Falcon et al, 2004). Por otro lado, se disponía de mutantes bien caracterizados que fueron descritos en el laboratorio. Existían mutantes puntuales en la subunidad PB2 de la polimerasa que no eran capaces de replicar el RNA viral pero que eran totalmente funcionales en su actividad transcripcional (Gastaminza et al, 2003). Del mismo modo, existían mutantes afectados en la actividad transcripcional pero inalterados en su actividad de replicación (Guilligay et al, 2008).

### 3.2 Complementación de polimerasas durante los procesos de replicación viral: ¿es posible rescatar por complementación en *trans* una polimerasa deficiente en replicación?

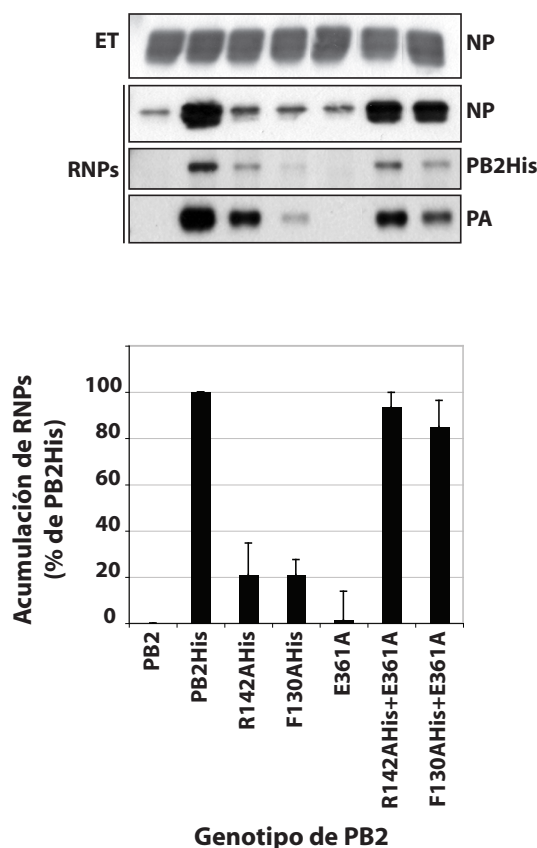
Con el sistema presentado anteriormente nos preguntamos si la actividad replicativa de RNPs reconstituidas con los mutantes deficientes en esta actividad podría ser rescatada en *trans* mediante la co-expresión de mutantes en transcripción. Se co-transfectó la línea celular HEK293T con los plásmidos que expresaban las subunidades PB1, PA, NP junto con un minireplicón viral (pHH clon23). A la mezcla de plásmidos se añadió el PB2 silvestre o mutantes puntuales de esta subunidad: R142A y F130A como mutantes en replicación,



**Figura R34. Diagrama de la aproximación experimental.** Se transfectó la línea celular HEK293T con los plásmidos de expresión de un replicón de 248 nucleótidos, de NP y de varias combinaciones de las subunidades de la polimerasa. Las posibles RNPs formadas se muestran en el diagrama, así como también las RNPs progenie esperadas, dependiendo del fenotipo de los mutantes de polimerasa utilizados, y aquellos purificables por cromatografía en Ni-NTA-agarosa. En la parte inferior de la figura se muestra la leyenda de los distintos elementos representados.

o E361A como mutante en transcripción. Además se co-expresaron combinaciones de estos mutantes: R142A+E361A y F130A+E361A. La proteína silvestre PB2 y los mutantes en replicación R142A y F130A tenían fusionada en su extremo C-terminal la etiqueta His (PB2His, R142AHis y F130AHis). Como control negativo se expresó en paralelo PB2 sin etiqueta (ver diagrama de la Figura R34). Tras la expresión de los complejos se realizó una purificación por histidinas con la resina Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa y la acumulación de RNPs progenie se determinó mediante WB con anticuerpos específicos para NP. Esta aproximación permitía medir la capacidad de replicación de las RNPs reconstituidas *in vivo*, ya que la ausencia de cualquier elemento de la RNP daba lugar a la supresión de la acumulación de RNPs (Gastaminza et al, 2003), que era directamente proporcional a la replicación del complejo. Por tanto, se esperaba detectar acumulación de

RNPs virales en los ensayos de reconstitución con la subunidad PB2 silvestre (PB2 y PB2His) y con el mutante de transcripción (E361A), pero no en los ensayos reconstituidos con mutantes de replicación (R142AHis y F130AHis). Sin embargo, como el mutante de transcripción no contenía la etiqueta His, en el material eluido de la resina de histidinas sólo se esperaba detectar RNPs en el ensayo reconstituido con PB2His silvestre (Figura R34), hecho que fue verificado experimentalmente (Figura R35). Si los mutantes de transcripción en PB2 habían sido capaces de rescatar la actividad replicativa en *trans* de los mutantes de replicación, se debería observar una acumulación de RNPs en el material purificado. Tras la co-expresión de ambos tipos de mutantes puntuales se purificaron los complejos y se observó que se había dado un fenómeno de complementación en *trans* (Figura R35, carriles R142AHis+E361A y F130AHis+E361A). Los dos mutantes en



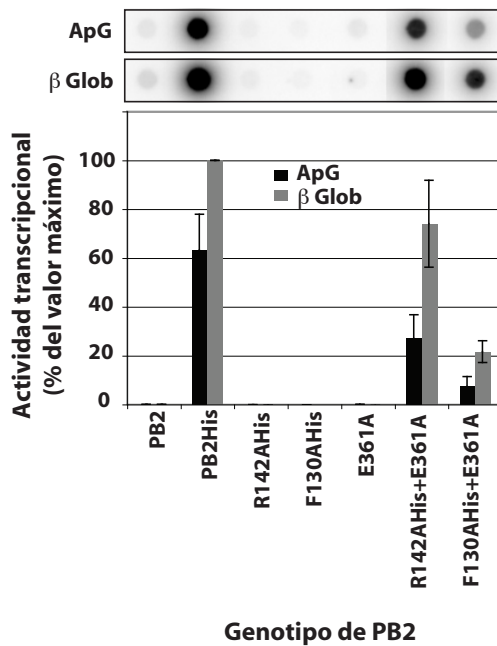
**Figura R35. Complementación génica de complejos de polimerasa recombinantes durante la replicación viral.** Se purificaron los complejos de RNPs progenie con la resina Ni-NTA-agarosa y se analizó el material purificado mediante WB con anticuerpos específicos de NP. El panel superior muestra la acumulación de NP en los extractos iniciales (ET) mientras que el inferior muestra la acumulación de NP de las RNPs purificadas (RNPs). La parte inferior de la figura muestra la acumulación de NP promediada de tres ensayos de complementación independientes y representados como un porcentaje del valor máximo.

replicación fueron rescatados con el mutante deficiente en transcripción, aunque en el caso de PB2R142AHis el rescate fue un poco mejor. Se analizó si ocurría lo mismo con distintos mutantes de transcripción, y se obtuvo un resultado muy similar al anterior (Figura R38-A). Se podía concluir que la subunidad PB2 de la polimerasa de las RNPs rescatadas por complementación y purificadas eran los mutantes en replicación porque: a) se pudieron purificar por afinidad sobre Ni<sup>++</sup>-NTA-agarosa, y b) la movilidad de PB2 en un gel de acrilamida era la correspondiente a la subunidad con la etiqueta His (Figura R37, comparar en el extracto celular la movilidad de PB2 con la de PB2His; Figura R35, comparar la movilidad de PB2His con la subunidad detectada en los puntos de R142AHis+E361 y F130AHis+E361A). De todos modos se determinó el fenotipo de las RNPs rescatadas mediante el análisis de su actividad biológica. La actividad transcripcional de estas RNPs se

ensayó *in vitro* usando el dinucleótido ApG o bien el RNA mensajero de  $\beta$ -globina (mRNA- $\beta$ -glob) como cebadores (Figura R36). El mRNA- $\beta$ -glob es un marcador de transcripción. Sin embargo, el primer ApG es únicamente un marcador de actividad biológica que da cuenta de la acumulación de RNPs. De esta medida se puede estimar indirectamente la actividad replicativa de las RNPs. El perfil de actividad transcripcional de las RNPs rescatadas con ambos cebadores fue idéntico al de las RNPs silvestres, lo que descartó que se tratara de RNPs con la polimerasa mutante E361, que es incapaz de utilizar el mRNA- $\beta$ -globina como cebador. Al igual que en el ensayo anterior, se analizaron otros mutantes de transcripción y se obtuvo el mismo resultado (Figura R38-B).

Las RNPs analizadas son producto de la amplificación en varias rondas de replicación de las RNPs paternas formadas por transfección. En el ensayo, únicamente la polimerasa



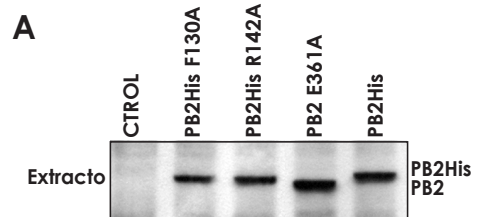


**Figura R36. Fenotipo de las RNPs complementadas in trans.** Las RNPs purificadas mostradas en la Figura R35 fueron analizadas mediante un ensayo de transcripción *in vitro* con los cebadores ApG (negro) y RNA mensajero de β-globina (gris). En la parte superior de la Figura se muestran los datos obtenidos del phosphorimager y en la parte inferior los resultados se presentan como un porcentaje del valor máximo y representan la media de dos experimentos independientes.

deficiente en transcripción es capaz de llevar a cabo la amplificación de RNPs, ya que la polimerasa deficiente en replicación no es capaz de replicar (Gastaminza et al, 2003). Por tanto, se puede concluir que la acumulación observada de RNPs mutantes en replicación se debía a un fenómeno de complementación in trans de la replicación viral por los mutantes en transcripción. El ensayo no permitió revelar si la síntesis replicativa fue llevada a cabo por la polimerasa que formaba parte de las RNPs o por otra distinta a la residente, ya que ambos complejos estaban disponibles en las células co-transfectadas. Los resultados también demostraron que un complejo de polimerasa distinto al responsable de la síntesis del RNA era capaz de dirigir la encapsidación del producto de RNA viral. En este caso se observó que el producto de replicación llevado a cabo por la polimerasa mutante en transcripción podía asociarse a la polimerasa mutante en replicación. De hecho, la eficiencia del rescate obtenida fue de un 50-70% (Figura R36) lo que estaría de acuerdo con la posibilidad de que ambos tipos de polimerasa compitieran para asociarse al nuevo RNA, aunque sólo el 50%

de las RNPs generadas podían ser detectadas, ya que contenían la etiqueta His.

Como resumen, los resultados obtenidos indican que el complejo de la polimerasa viral es capaz de complementar in trans a otros complejos y que la polimerasa responsable de encapsidar el RNA progenie es distinta de la que lo sintetiza.



**Figura R37. Western-blot de los distintos mutantes de la subunidad PB2.** Los extractos celulares iniciales se analizaron mediante WB con anticuerpos específicos de la subunidad PB2. A la derecha se indica la posición de las proteínas detectadas.

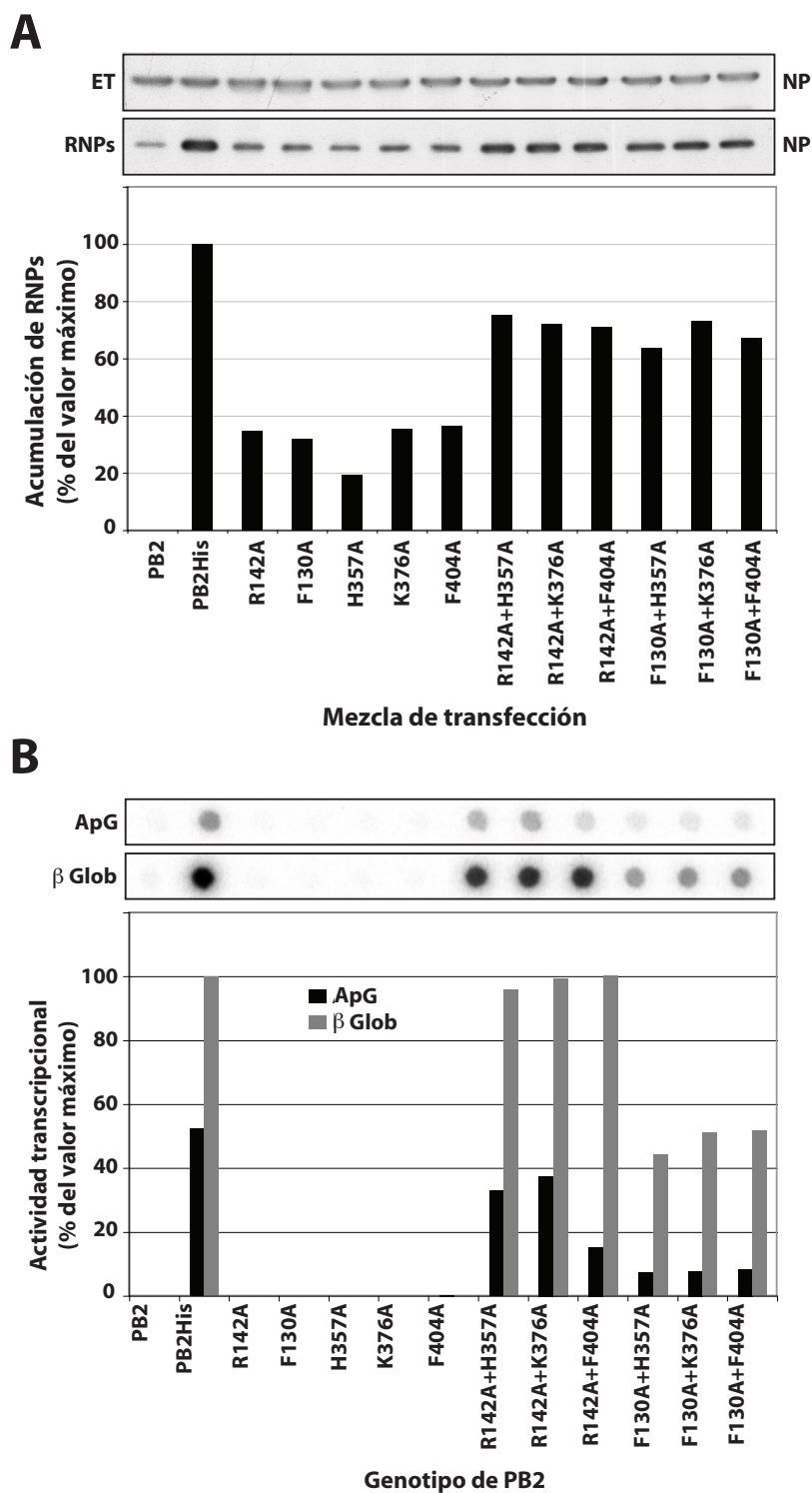


Figura R38. Análisis de la complementación génica de complejos de polimerasa con distintos mutantes en transcripción (A) y estudio del fenotipo de las RNPs complementadas en *trans* (B). Se analizaron nuevos mutantes en transcripción de la subunidad PB2 tal y como se describe en las Figuras R35 y R36.



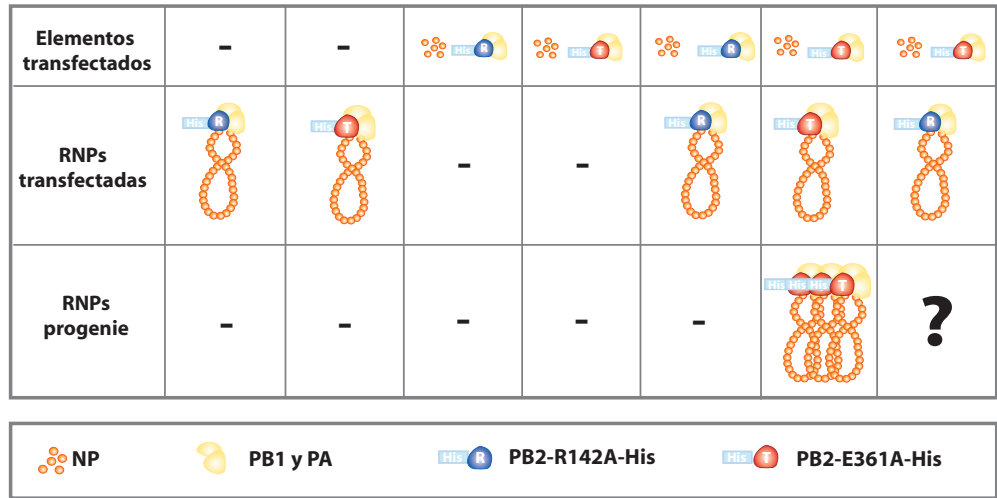
### 3.3 ¿Es la polimerasa residente en la RNP responsable de la síntesis del RNA viral progenie?

El abordaje anterior no permitió distinguir qué polimerasa era responsable de la replicación del RNA progenie, la que forma parte de las RNPs u otra soluble. Para analizar este punto se transfectaron directamente RNPs purificadas conteniendo cada una de las mutaciones en PB2 en células que previamente expresaban polimerasa y NP (Figura R39). El rescate por complementación de RNPs deficientes en replicación que contenían la mutación R142A había permitido la purificación de estas RNPs (RNP142)(Figura R40-A). En paralelo se habían generado y purificado RNPs deficientes en transcripción con la mutación E361A (RNP361). Ambas RNPs se transfectaron en cultivos celulares que expresaban NP y polimerasa R142AHis (POL142) o E361AHis (POL361), y se utilizaron como molde para ensayos de replicación *in vivo*. Antes de la transfección de dichas RNPs

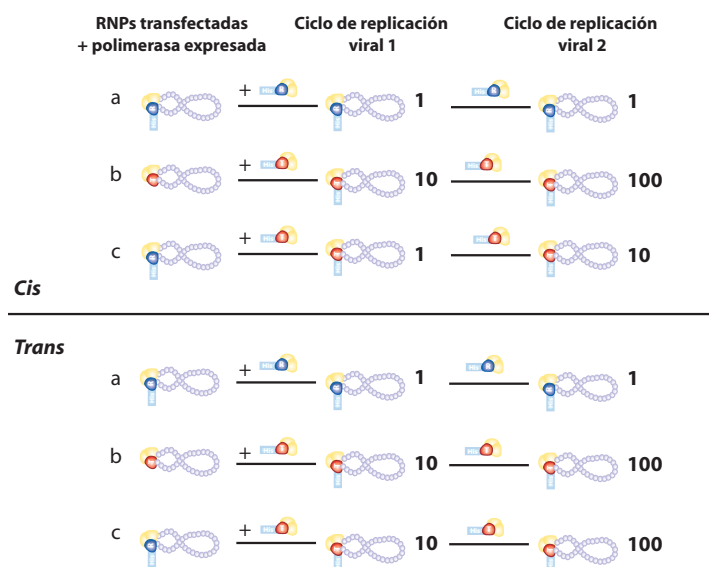
se verificó su actividad biológica mediante un ensayo de actividad transcripcional *in vitro* (Figura R40-B). Como controles negativos se transfectaron las RNPs purificadas en células que habían sido previamente transfectadas con un plásmido pCMV vacío, o bien se expresaron la polimerasa y NP en ausencia de las RNP molde. La acumulación de RNPs producto de la replicación viral se analizó mediante una purificación con la resina Ni<sup>++</sup>-NTA-agarosa, WB con anticuerpos específicos de NP y ensayos de transcripción *in vitro*. El diagrama de la Figura R41 muestra los posibles resultados en los casos de que la polimerasa residente fuera responsable de la replicación (replicación en *cis*) o fuera otra polimerasa distinta la responsable (replicación en *trans*).

En el posible caso de una replicación en *cis*:

a) **RNP142-POL142**: Se sabe que se pueden rescatar virus con la mutación PB2-R142A, aunque el título viral era muy inferior al de la cepa silvestre (Gastaminza et al, 2003). Por



**Figura R39. Diagrama de la aproximación experimental.** Se transfectó la línea celular HEK283T con los plásmidos de expresión de NP y de varias combinaciones de subunidades de la polimerasa como se indica en la Figura. A las 24 horas post-transfección, en algunos casos también se transfectaron RNPs rescatadas por complementación mutantes en replicación (RNP142) y RNPs mutantes en transcripción (RNP361). Las posibles RNPs progenie esperadas se muestran en el diagrama dependiendo del genotipo de los mutantes de polimerasa utilizados. En la parte inferior de la figura se muestra la leyenda de los distintos elementos representados.



**Figura R40. Diagrama de las distintas posibilidades de replicación en *cis* y en *trans*.** El esquema muestra tanto los complejos de polimerasa soluble presentes en los cultivos como las RNPs transfectadas. A modo de resumen se muestran dos ciclos de replicación viral. La predicción de la acumulación de RNPs progenie se muestra en cada caso a la derecha de cada RNP y son unidades arbitrarias.

tanto, las RNPs con esta mutación son capaces de llevar a cabo la replicación viral con niveles muy bajos. De hecho, la acumulación de RNPs *in vivo* con esta mutación fue indetectable (Figura R35 y R36). A esta replicación de fondo se le asigna arbitrariamente un valor 1.

b) **RNP361-POL361:** Tanto las RNPs transfectadas como la polimerasa expresada tendrían la capacidad de replicación intacta. A esta replicación usada como control positivo se le asigna un valor 100.

c) **RNP142-POL361:** Las RNPs-142 transfectadas podrían dar lugar a una población muy pequeña de RNPs progenie (véase a)). Pero como se ha descrito en el apartado anterior, el RNA progenie sería encapsidado por un complejo de polimerasa distinto al que lo replica, por tanto sería posible que se generaran RNPs-361, aunque la acumulación sería indetectable. En una segunda ronda de replicación estas RNPs tendrían la capacidad de replicar, aunque no se podrían igualar los niveles de acumulación de RNPs obtenidos en el caso b). A este nivel de replicación se le asigna arbitrariamente el valor de 10.

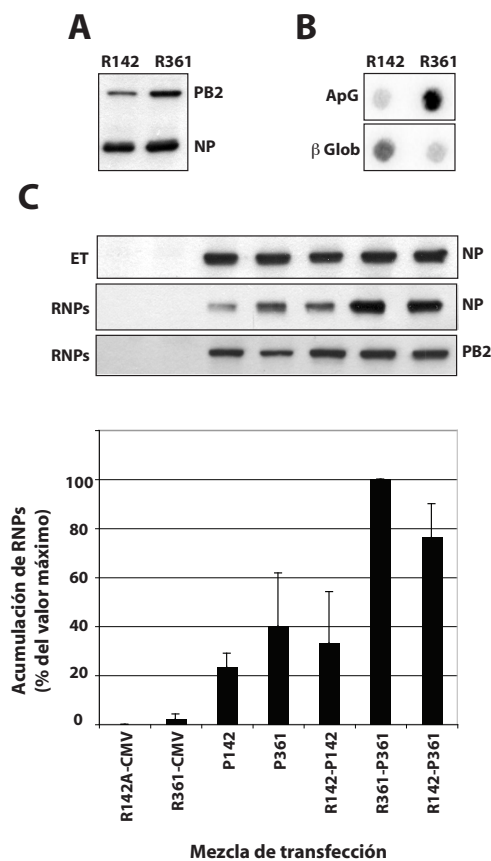
En el posible caso de una replicación en *trans*:

a) **RNP142-POL142:** Al igual que antes, la acumulación de RNPs progenie predicha sería de 1.

b) **RNP361-POL361:** Así mismo, la acumulación de RNPs progenie predicha sería de 100.

c) **RNP142-POL361:** En el caso de una replicación en *trans*, la polimerasa responsable de llevar a cabo la replicación sería mutante en transcripción, pero no en replicación. Por tanto, aunque las RNPs que actuarían como molde serían distintas en los casos b) y c), la acumulación de RNPs progenie por replicación sería indistinguible en ambos casos, y la acumulación predicha sería 100.

Los cultivos celulares que expresaron la polimerasa E361His y NP (POL361) y que fueron transfectados con RNPs-E361AHis (RNP361) fueron el control positivo del ensayo (Figura R41-C, RNP361-POL361). No se observó NP en los controles donde se transfectaron RNPs mutantes en células que expresaban el plásmido vacío (CMV) (Figura R41-C, RNP142-

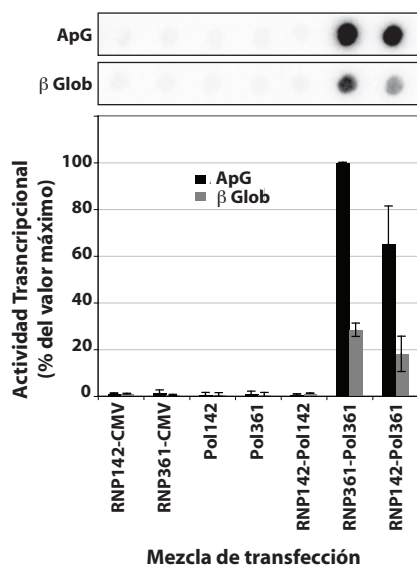


CMV y RNP361-CMV). Los niveles detectados de NP en los ensayos de expresión de polimerasa mutante y NP en ausencia del genoma viral (POL142 y POL361) definieron los niveles de unión inespecífica de NP a la resina de Ni<sup>++</sup>-NTA-agarosa, es decir, los niveles de fondo del ensayo (Figura R41-C, POL142 y POL361). La transfección de RNPs mutantes en replicación (RNP142) en células que expresaban la misma polimerasa mutante (POL142) y NP no dio lugar a RNPs progenie ya que no incrementaron los niveles de NP detectados respecto al fondo (Figura R41-C, RNP142-POL142). Sin embargo se detectaron niveles de NP cercanos a los del control en los casos donde las RNPs mutantes en replicación (RNP142) se transfectaron en células que expresaban polimerasa mutante en transcripción (POL361) y NP (Figura R41-C, RNP142-POL361). Por tanto los resultados sugerían que la replicación viral ocurre en

**Figura R41. Replicación en trans de RNPs llevada a cabo por el complejo soluble de polimerasa viral.**

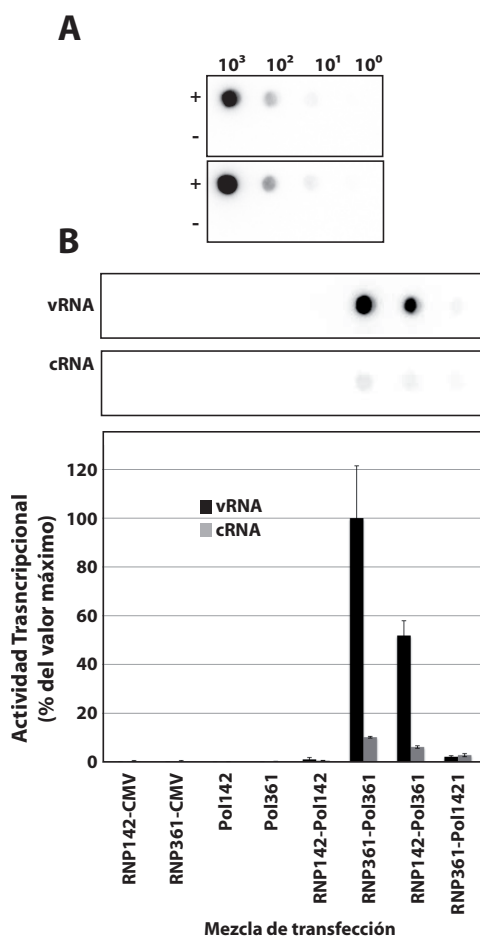
(A) Análisis de la acumulación de RNPs purificadas por Ni-NTA-agarosa mediante WB con anticuerpos específicos de PB2 y NP. A la derecha se muestra la posición de las proteínas detectadas. (B) Actividad transcripcional de las RNPs-142 rescatadas por complementación y de las RNPs-361. (C) Se purificaron los complejos de RNPs progenie con la resina Ni-NTA-agarosa y se analizó el material purificado mediante WB con anticuerpos específicos de NP y PB2. El panel superior muestra la acumulación de NP en los extractos iniciales (ET) mientras que el inferior muestra la acumulación de NP de las RNPs purificadas (RNPs). La parte inferior de la figura muestra la acumulación de NP promediada de dos ensayos de complementación independientes y representados como porcentaje del valor máximo.

*trans*. El fenotipo de las RNPs purificadas se verificó mediante ensayos de actividad transcripcional (Figura R42). Mediante el uso del cebador ApG se analizó de nuevo la acumulación de RNPs progenie mientras que con el RNA mensajero de β-globina se analizó la actividad de *cap-snatching* de las RNPs. Los niveles de actividad transcripcional detectados en todos los controles (RNP142-CMV, RNP361-CMV, POL142, POL361 y RNP142-POL142) fueron indetectables. Sin embargo los niveles de actividad de los ensayos RNP361-POL361 y RNP142-POL361 con ApG fueron mucho mayores que con el mRNA-β-globina, lo que indicó que las RNPs progenie contenían la polimerasa POL361 mutante de transcripción. La menor acumulación de RNPs en el caso RNP142-POL361 podría ser debido a que las cantidades de RNPs transfectadas no eran iguales en ambos casos. La concentración de RNP142 rescatadas por complementación y purificadas era menor que la de RNP361. Estos resultados indicaron que una polimerasa distinta a la que forma la RNP era la responsable de la síntesis replicativa del RNA progenie y a la encapsidación del nuevo RNA sintetizado. Como se ha comentado anteriormente, las RNPs que se obtienen



**Figura R42. Fenotipo de las RNPs complementadas en trans.** Las RNPs purificadas mostradas en la Figura R41 fueron analizadas mediante un ensayo de transcripción in vitro con los cebadores ApG (negro) y RNA mensajero de β-globina (gris). En la parte superior de la figura se muestran los datos obtenidos del phosphorimager y en la parte inferior los resultados se presentan como un porcentaje del valor máximo y representan la media de dos experimentos independientes.

tras una reconstitución son vRNPs, es decir, las RNPs progenie. Para demostrar que los fenómenos de complementación intragénica ocurrían durante la síntesis del vRNA progenie se determinó la naturaleza del RNA de las RNPs obtenidas por complementación (mostradas en la Figura R42). Además de analizar el RNA de las RNPs obtenidas como en el ensayo mostrado en la Figura R42, se analizó también el de las RNPs obtenidas tras la transfección de RNPs-361 en células que expresaban POL-142. Tras la purificación de RNPs obtenidas por complementación se aisló en RNA y se analizó mediante la hibridación *dot-blot* con ribosondas de polaridad positiva y negativa que comprenden la secuencia de NS (Materiales y Métodos, apartado 2). Los resultados del análisis del RNA (Figura R43) mostraron que las RNPs obtenidas



**Figura R43. Determinación de la polaridad del RNA aislado de las RNPs producto de la complementación.** Se realizó un ensayo igual al mostrado en la Figura R42 en el que se añadió el punto RNP361-POL142. Se aisló el RNA de las RNPs purificadas y se llevó a cabo una hibridación por dot-blot utilizando ribosondas específicas tanto para la polaridad positiva como para la negativa del pseudo-genoma NS (clon 23). (A) Controles de la hibridación. Hibridación de las ribosondas con el plásmido pHHclon23 (control positivo) y con RNA de levadura (control negativo). En la parte superior de la figura se muestra la cantidad de muestra cargada en el filtro ( $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  y  $10^0$  ng). (B) Hibridación de las ribosondas con el RNA aislado de las RNPs producto de la complementación. En la parte superior de la figura se muestran los datos obtenidos del phosphorimager y en la parte inferior los resultados se presentan como un porcentaje del valor máximo. A la izquierda se muestra la ribosonda utilizada: vRNA (que detecta el RNA de polaridad negativa) y cRNA (que detecta el RNA de polaridad positiva).

del ensayo de complementación contenían mayoritariamente vRNA. Sin embargo, las RNP-361, que son activas en replicación, en presencia de una polimerasa deficiente en esta función no son capaces de replicar. Los niveles de vRNA son casi nulos y los niveles de cRNA son más bajos que en el caso de RNP361-POL361. Por tanto los resultados son compatibles con un modelos de replicación de vRNA a cRNA y de cRNA a vRNA en *trans*.

Los resultados presentados demuestran que tres complejos de polimerasa intervienen durante la replicación del RNA viral. Llamamos a la polimerasa 1 aquella que forma parte de la RNP paterna, también llamada polimerasa residente. El RNA de la RNP es replicado por una polimerasa soluble que nombramos como polimerasa 2. Se trata de una polimerasa no residente distinta de la que forma la RNP paterna. Por último el RNA de nueva síntesis es encapsidado por una tercera polimerasa que nombramos como polimerasa 3. Esta última es no residente y distinta de la polimerasa 2. La intervención de tres polimerasas en el proceso de replicación podría ser la base de los fenómenos observados de complementación en *trans* de la actividad de mutantes en dicha función.



# DISCUSIÓN





## FACTORES CELULARES IMPLICADOS EL CICLO INFECTIVO DEL VIRUS DE LA GRIPE

### 1. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES CELULARES ASOCIADOS A LA POLIMERASA VIRAL

Los virus son parásitos intracelulares obligados debido a la limitada información genética que contienen. El virus de la gripe expresa solamente once proteínas y por ello requiere la participación de factores celulares para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral, expresión génica y transporte intracelular de estructuras virales. Además modifica e interfiere con proteínas celulares con el fin de bloquear la respuesta antiviral de la célula hospedadora. Actualmente se dispone de una larga lista de proteínas celulares que son capaces de interactuar con elementos virales (Anexo 1.1), pero sin embargo se desconoce el significado funcional de la mayoría de las interacciones caracterizadas.

A lo largo de los años se han descrito nuevas técnicas, y las existentes han sufrido mejoras experimentales, que han permitido ir avanzando en el estudio de factores celulares necesarios para la replicación viral. Los trabajos más antiguos abordaron este objetivo mediante la técnica de doble híbrido utilizando como cebo las proteínas virales PA, NS1, NP y PB1 (Falcón et al, 1999; Honda et al, 2007; Huarte et al, 2001; O'Neill & Palese, 1995). Esta técnica permite la identificación de factores que interactúan de modo tanto estable como transitorio. Sin embargo, es posible que modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales hagan que un determinado factor ya no sea de utilidad para el virus. También se identificaron factores implicados en la replicación viral mediante el fraccionamiento bioquímico y complementación (Momose et al, 1996; Shimizu et al, 1994). Así, se estudió

la actividad replicativa de vRNPs purificadas de viriones suplementadas con extractos nucleares de células no infectadas (producto de un fraccionamiento bioquímico), y se identificaron fracciones celulares capaces de activar la síntesis viral. A partir de este momento se planteó la necesidad de realizar un abordaje más genérico, y durante la realización de esta Tesis, varios grupos hemos analizado complejos proteicos purificados por cromatografía de afinidad, en combinación con técnicas de identificación de proteínas por espectrometría de masas (Engelhardt et al, 2005; Mayer et al, 2007). Este abordaje permite tanto la purificación de complejos intracelulares como su caracterización. Sin embargo, sólo permite la identificación de factores celulares asociados de modo estable, ya que las interacciones transitorias difícilmente son detectadas. Recientemente, otros grupos han realizado un análisis más general basado en la generación de un minireplicón de gripe en levaduras (Naito et al, 2007a), de las que se dispone una genoteca de mutantes que cubre el 85% de sus genes. La levadura ofrece la ventaja de ser un organismo eucariota sencillo con una baja complejidad génica, pero es filogenéticamente distante de la célula hospedadora normal. Finalmente, tras la consolidación de las técnicas de silenciamiento génico, Kawaoka y cols. han puesto a punto un sistema de análisis de factores necesarios para la replicación mediante RNA interferente. El sistema modelo es *Drosophila melanogaster*, y se ha analizado la estimulación o inhibición de la replicación viral tras el silenciamiento de alrededor del 90% de sus genes (Hao et al, 2008). Se trata sin duda de nuevos abordajes que permitirán la identificación de factores hasta ahora desconocidos como moduladores de la replicación viral.

Para el estudio de las relaciones establecidas por el virus de la gripe con la célula hospedadora se analizaron las interacciones de la polimerasa viral con el proteoma celular. Para

ello se sobre-expresó una polimerasa viral recombinante mediante la transfección de los cDNAs de sus subunidades, de las cuales una contenía una etiqueta TAP. La purificación por TAP permite preservar muchas de las interacciones establecidas entre proteínas. La condición ideal hubiera sido la disponibilidad de un virus recombinante que tuviera la etiqueta TAP en alguna subunidad de la polimerasa, pero en el laboratorio no fue posible rescatar dicho virus (A. Falcón, resultados no publicados). Existen varias evidencias que apoyan la correcta formación del complejo recombinante *in vivo*: a) El análisis de la purificación muestra la copurificación de las tres subunidades (Figura R4); b) La actividad biológica de RNPs reconstituidas con la etiqueta TAP en la subunidad PB1 es del nivel de las silvestres (Figura R3 y resultados previos del laboratorio (Area et al, 2004)). A pesar de que el complejo delecionado de polimerasa 256TAP no es capaz de llevar a cabo la síntesis de RNA *in vivo*, mantiene la capacidad de unir el RNA viral de modo específico (Torreira, 2006); c) La mayor parte del complejo purificado tiene un tamaño compatible con el esperado para la polimerasa viral (Figura R28). La identificación de las proteínas presentes en los complejos purificados se llevó a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Tabla R1 y R2). Entre los factores identificados se encuentran proteínas nucleares implicadas en metabolismo del RNA y proteínas citosólicas de transporte celular y traducción, lo que estaría de acuerdo con la localización nuclear de los procesos de replicación del virus y la naturaleza de su genoma. No se identificaron factores celulares ya descritos en otros trabajos, pero se detectó la presencia de la RNAPII mediante WB (Figura R10). Es posible que la interacción de factores como hCLE o Hsp90 entre otros, sea débil o transitoria, por lo que no esperaríamos detectarlos mediante esta aproximación. Todos los factores identificados podrían estar implicados en el ciclo de la infección viral ya

que la mayoría interviene en el metabolismo del RNA. Durante la infección con gripe no se altera ni el patrón de expresión de los factores celulares analizados (Figura F11) ni tampoco su localización celular (Figuras F12 y F13), a diferencia de lo que ocurre en otras infecciones virales. Sin embargo, dado que los procesos de replicación y transcripción virales ocurren en el núcleo, las RNPs del virus colocalizan en este compartimento a tiempos tempranos con los factores hnRNPM, DDX5, SFPQ y NXP2 (Figura F14). A tiempos más tardíos las RNPs colocalizan con el factor DDX3 en el citosol. No obstante, mediante ensayos de silenciamiento génico se ha observado que los factores hnRNPM, DDX5 y DDX3 no son imprescindibles para el ciclo viral, mientras que la ausencia del factor SFPQ afecta notablemente la viabilidad viral (Figuras R17-21). La función que podrían ejercer estos factores durante la infección viral se discute a continuación.

## 2. ESTRECHA RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA VIRAL Y CELULAR

Los virus de la gripe llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada. Ambos procesos son realizados por una RNA polimerasa RNA dependiente codificada por el virus. Mientras que la replicación es una síntesis *de novo* a partir del molde viral, la transcripción requiere de un cebador que el virus roba de los mensajeros celulares. Los mRNAs virales, igual que los celulares, sufren modificaciones post-transcripcionales: tienen un extremo 5' cap (que proviene de los mRNAs celulares), una cola poliA sintetizada por la polimerasa viral, y algunos mRNAs son procesados por la maquinaria celular de *splicing*. De modo que el virus, que codifica un total de once proteínas, necesita la acción numerosos factores celulares para la correcta expresión génica, que implica los procesos de replicación y transcripción,

transporte de mRNAs y traducción viral.

## 2.1. ¿Dónde ocurre la síntesis de RNA viral? ¿Tiene lugar en asociación con la RNAPII celular?

A día de hoy se sabe que el virus de la gripe es uno de los pocos virus RNA capaces de llevar a cabo su ciclo replicativo en el núcleo de la célula infectada. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, no se sabe con exactitud la localización nuclear de dichos procesos. Tal y como se ha comentado anteriormente, la polimerasa viral sintetiza el mRNA y el cRNA a partir del mismo molde vRNA paterno mediante dos mecanismos distintos de iniciación y terminación (Palese & Shaw, 2007). Para los procesos de transcripción el virus depende de la síntesis celular de mRNAs con estructuras 5' cap que la polimerasa roba y corta para ser utilizados como cebadores. La síntesis de mRNAs celulares es llevada a cabo por la RNAPII, que se encuentra en el núcleo de la célula en complejos macromoleculares en los que se encuentran factores de transcripción, factores de procesamiento post-transcripcional, y estructuras de cromatina. El procesamiento post-transcripcional, que incluye el *capping*, el *splicing* y la poliadenilación, ocurren de manera co-transcripcional en el núcleo celular. Además estos procesos están acoplados a la exportación de los mensajeros celulares para su posterior traducción. Es por ello que la idea de que los procesos de síntesis virales ocurran en las zonas transcripcionalmente activas de la célula resulta muy atractiva. De hecho, hace ya muchos años se propuso que la síntesis viral ocurre en zonas fijas del núcleo (Jackson et al, 1982), y de modo más reciente se ha visto que la RNAPII colocaliza con la polimerasa viral (Engelhardt et al, 2005). Otros datos que apoyan estos resultados confirman que las vRNPs se encuentran asociadas a fracciones insolubles del núcleo (López-Turiso et al, 1990; Takizawa et al, 2006), es decir a ma-

triz nuclear, y concretamente a zonas transcripcionalmente activas de la cromatina (Chan et al, 2006; Takizawa et al, 2006). Se ha propuesto que esta interacción está mediada por NP tras la observación de una interacción *in vitro* con nucleosomas (García-Robles et al, 2005), aunque en el laboratorio de A. Nieto también se ha descrito la asociación de un remodelador de cromatina, CHD6, con la subunidad PA de la polimerasa (datos no publicados). Entre las proteínas identificadas asociadas a la polimerasa viral en esta Tesis, se encuentra la proteína de matriz nuclear NXP2 (Figura R7). Este factor de transcripción tiene dominios de unión a RNA, a matriz nuclear y a proteínas (Kimura et al, 2002) y podría ejercer un papel como proteína adaptadora entre la RNP viral y la matriz nuclear ya que NXP2 colocaliza en el núcleo con las RNPs durante las primeras etapas de la infección (Figura F14).

La asociación de la polimerasa con la RNAPII podría estar facilitando el acceso a los pre-mRNAs que se están sintetizando. La polimerasa viral es capaz de utilizar como molde un mRNA totalmente procesado, sin embargo este RNA en la célula se encuentra en forma de mRNP y quizás no sería accesible. Además, la interacción con la RNAPII podría suponer el acercamiento de muchos factores celulares. La proteína hCLE es un factor de transcripción celular (Perez-Gonzalez et al, 2006) que interacciona con la polimerasa viral (Huarte et al, 2001) y a su vez con la RNAPII. Se ha propuesto que este factor podría mediar la interacción entre ambas polimerasas. Resultados de esta Tesis muestran que los factores hnRNPM, DDX5 y SFPQ interaccionan con la polimerasa viral (Figura F7) y colocalizan con las RNPs durante las primeras etapas de la infección viral (Figura F14). Las tres proteínas tienen en común que están implicadas en la transcripción celular e interaccionan con la RNAPII o con sus productos. hnRNP M es una proteína que se une a los transcritos nacientes

de la RNAPII (Kafasla et al, 2002) y está implicada en la regulación del *splicing* (Hase et al, 2006). La proteína multifuncional SFPQ está implicada en transcripción celular y *splicing*. Las proteínas SFPQ y NonO presentan una gran homología entre ellas y son factores de unión a DNA y a RNA que forman un heterodímero multifuncional (Revisado en Shav-Tal et al.(Shav-Tal & Zipori, 2002)). Están implicadas en procesos nucleares como la regulación de la transcripción (Emili et al, 2002; Mathur et al, 2001; Rosonina et al, 2005; Tapia-Paez et al, 2008; Urban et al, 2002; Wu et al, 2006), en el procesamiento del RNA, en la retención de mRNAs editados, en la relajación del DNA y en la tumorigénesis. Este factor es necesario para la terminación de transcritos de la RNAPII ya que interacciona con la exonucleasa XRN2 (Kaneke et al, 2007), y es capaz de interactuar fuertemente con el CTD de la RNAPII, lo que incrementa los niveles de *splicing* y de procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs (Rosonina et al, 2005). DDX5 es una helicasa de RNA (Hirling et al, 1989) perteneciente a la familia de las DEAD box, y junto con DDX17 están implicadas en la proliferación y diferenciación celular. Es un regulador transcripcional que actúa como co-activador o como co-represor dependiendo del contexto del promotor y del complejo transcripcional en el que se encuentre (Bates et al, 2005; Caretti et al, 2007; Endoh et al, 1999; Jensen et al, 2008; Metivier et al, 2003; Rossow & Janknecht, 2003; Watanabe et al, 2001; Wilson et al, 2004). Además forma parte del complejo Drosha en ratón y está implicada en el procesamiento primario de miRNAs y rRNAs (Fukuda et al, 2007). Una de las funciones que podrían desempeñar estas proteínas durante el ciclo viral es la de mediar la aproximación entre la transcripción viral y celular. Sin embargo, son proteínas con múltiples funciones y podrían estar implicadas en otros procesos virales que se comentan a continuación.

El virus, a diferencia de otros, no codifica ninguna helicasa de RNA. El genoma del virus se encuentra protegido por moléculas de NP a lo largo de toda su longitud con excepción de sus extremos, los cuales presentan una estructura secundaria protegida por la RNA polimerasa. Durante los procesos de replicación y transcripción el virus podría necesitar una helicasa que remodelara constantemente las interacciones RNA-proteína o RNA-RNA. La helicasa celular UAP56 y la proteína Tat-SF1, dos estimuladores de la síntesis viral, son factores necesarios para la interacción de NP con el RNA de nueva síntesis para la correcta formación de las RNPs (Momose et al, 2001; Naito et al, 2007a), y ambas interaccionan con la RNPII (Fong & Zhou, 2001; Li et al, 2005a). DDX3 y DDX5 son dos RNA helicasas dependientes de ATP identificadas en esta Memoria asociadas a la polimerasa viral. Son componentes de la familia de proteínas DEAD-box implicadas en la remodelación de estructuras de RNA, y en concreto de dúplex cortos de RNA. Estas proteínas podrían ejercer una función en la reorganización de la RNP para facilitar la síntesis viral. De hecho, DDX5 es reclutada por la polimerasa de HCV al complejo de replicación y se cree que podría facilitar el desenrollamiento del RNA del virus. Dado que DDX5 tiene un papel importante en el reclutamiento de componentes específicos de la maquinaria transcripcional y facilita la formación y estabilización del complejo de iniciación en genes como MyoD y RunX2 (Caretti et al, 2007), para HCV podría suponer el acercamiento al resto de factores transcripcionales celulares (Goh et al, 2004). Ensayos de silenciamiento génico muestran que DDX5 no es un factor esencial para el crecimiento del virus de la gripe (Figura F17) ya que el título viral apenas baja 10 veces. Este descenso de la infectividad viral no es muy significativo en la infección en cultivos celulares, sin embargo en el entorno ecológico del virus podría suponer un impedimento para llevar a cabo el ciclo viral. Por otro lado, hay

que tener en cuenta que DDX5 tiene funciones redundantes con otro miembro de la misma familia, DDX17, por lo que habría que silenciar génicamente ambas proteínas para ver si realmente es importante para el ciclo viral, como ocurre en el caso de la biogénesis de ribosomas (Fuller-Pace & Ali, 2008; Jalal et al, 2007). La helicasa DDX3 colocaliza con las RNPs en el citoplasma a tiempos tardíos (Figura F14), por lo que resulta difícil pensar que esté implicada en la síntesis del RNA viral. Sin embargo es una proteína de transporte núcleo-citosol (Yedavalli et al, 2004) (*shuttling protein*) y su función se discutirá más adelante.

En conjunto, los datos presentados en esta Tesis y los ya publicados apuntan a que los procesos de replicación y transcripción viral ocurren en íntima asociación con el transcritoma celular.

## 2.2. *Splicing* y exportación de los mRNAs virales. ¿Cómo se exportan del núcleo los mRNAs virales que no son procesados por la maquinaria celular de *splicing*?

Para la correcta expresión de las proteínas codificadas por los segmentos virales 7 y 8 los mRNAs deben ser procesados post-transcripcionalmente (Inglis et al, 1979; Inglis & Brown, 1981; Lamb & Choppin, 1981; Lamb et al, 1980). Es la maquinaria de *splicing* celular la que lleva a cabo la eliminación de intrones virales y es un proceso muy regulado durante la infección (Palese & Shaw, 2007; Valcárcel et al, 1991). Sin embargo NS1 tiene un papel inhibitorio en la regulación del *splicing*: inhibe el *splicing* de pre-mRNAs celulares (Fortes et al, 1994; Nemeroff et al, 1998; Qiu et al, 1995) y el de su propio mRNA (Garaigorta & Ortin, 2007). Los fenómenos de *splicing* celular y transcripción están acoplados co-transcripcionalmente, por lo que los complejos macromoleculares están formados por múltiples proteínas implicadas en regulación de la transcripción, factores de

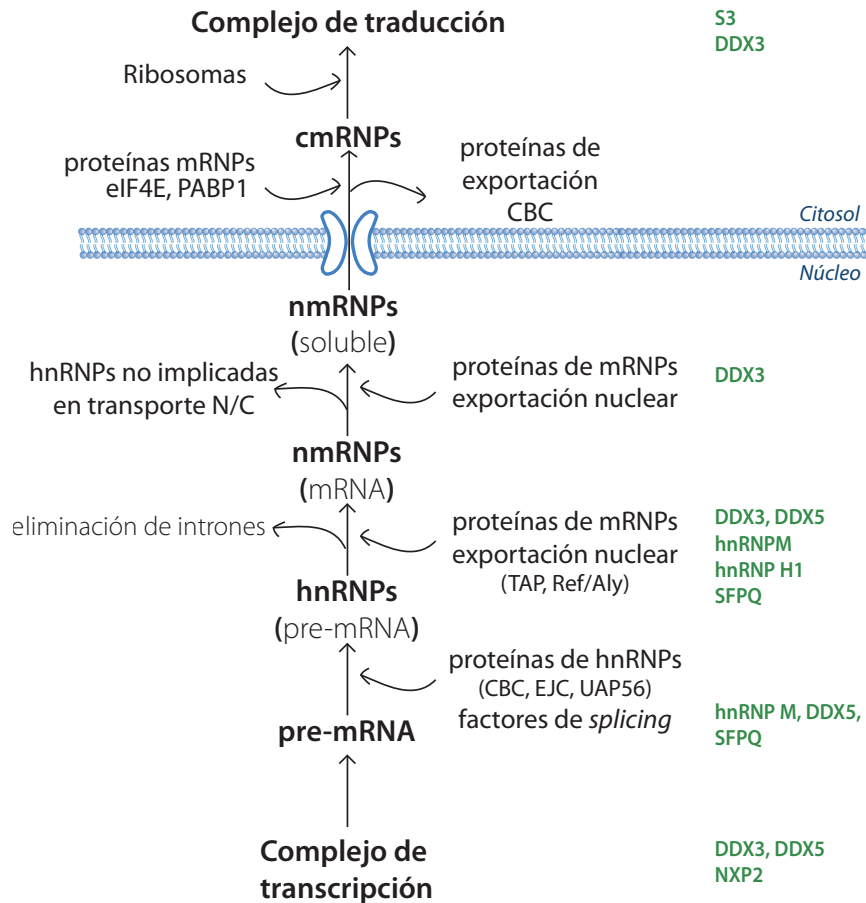
*splicing*, de poliadenilación, etc. La polimerasa viral regula el sitio de *splicing* del segmento M (Shih et al, 1995) y se han descrito varios factores implicados en *splicing* asociados a la polimerasa. Sin embargo, el factor de *splicing* UAP56 no afecta a la regulación del *splicing* de los mRNAs virales, sino que ejerce una función de chaperona de NP (Momose et al, 2001). De los factores identificados en esta Tesis, las proteínas hnRNPH1, hnRNPM, DDX3, DDX5, y SFPQ forman parte de complejos de *splicing* celular. Las hnRNPs unen los pre-mRNAs nacientes de la RNAPII y la mayoría regulan o participan en el control del *splicing* (Venables et al, 2008) aunque cada una de ellas afecta a genes distintos. hnRNPH1 está implicada en la regulación del *splicing* alternativo y puede tener actividad estimuladora o represora dependiendo del contexto en el que se encuentre (Black, 2003). De hecho este factor tiene un papel modulador del *splicing* de HIV (Caputi & Zahler, 2002). hnRNPM puede promover la inclusión o el salto de algunos exones alternativos (Hovhannisyan & Carstens, 2007; Venables et al, 2008), y forma parte de los complejos tanto antes del *splicing* (pre-spliceosoma) como en etapas posteriores (Hase et al, 2006; Kafasla et al, 2002). La proteína DDX3 también se encuentra formando parte del spliceosoma (Liu, 2002; Merz et al, 2007; Zhou et al, 2002), y DDX5 se cree que es un adaptador entre la transcripción y el *splicing*, y es un factor esencial para este proceso (Auboeuf et al, 2002; Camats et al, 2008; Guil et al, 2003; Liu, 2002; Merz et al, 2007; Neubauer et al, 1998). A pesar de las implicaciones de todos estos factores en *splicing*, la ausencia de los mismos no afecta la relación de expresión viral entre las proteínas M1/M2 (Figura F19), por lo que estos factores deben de estar implicados en otras etapas virales. Finalmente, SFPQ está también implicada en este proceso post-transcripcional (Patton et al, 1993; Peng et al, 2006) y se ha sugerido que ejerce una función de coordinación de la transcripción

y el *splicing*, ya que es reclutada a zonas de promotores activos (Rosonina et al, 2005). A pesar de ser un factor importante para el ciclo viral (Figuras F17-19) SFPQ tampoco está implicada en el *splicing* viral (Figura F19). Hay que destacar que SFPQ está implicada en el procesamiento post-transcripcional de HBV incrementando o favoreciendo el *splicing* (Heise et al, 2006). En HIV ejerce una función totalmente opuesta. Los mRNAs que no han sufrido *splicing* o lo han hecho de forma parcial contienen una señal de inestabilidad (INS) en *cis*. SFPQ se une a estos elementos y secuestra a los mRNAs virales de las vías productivas como el *splicing* y la exportación del núcleo. De este modo los RNAs son degradados (Zolotukhin et al, 2003). SFPQ también se une a los RNAs de ambas polaridades de HDV, pero todavía no se sabe que función ejerce sobre el ciclo viral (Greco-Stewart et al, 2007; Greco-Stewart et al, 2006). Por tanto, los factores descritos, que no intervienen en el procesamiento post-transcripcional de los mRNAs virales, podrían establecer un puente entre las polimerasas viral y celular o bien, como se comentará a continuación, un puente entre la transcripción viral y la exportación de los mRNAs.

El procesamiento post-transcripcional celular está acoplado a la exportación del núcleo de los mRNAs maduros para su posterior traducción en el citosol. Los mRNAs celulares sufren un control exhaustivo antes de ser exportados, y aquellos que contienen intrones son degradados por la maquinaria celular. Todavía no se conoce cómo los mRNAs virales, que no contienen intrones o que han sido procesados parcialmente, pueden ser exportados por la maquinaria celular evadiendo su degradación. La proteína TAP/p15 (también conocida como NXF1-NXT1) es el principal receptor implicado en la exportación de mRNAs celulares. El receptor CRM1 es menos general y es responsable de la exportación de mRNAs

que contienen elementos AREs. Las proteínas ALY/REF y SRs son adaptadores que unen los mRNAs, y finalmente el complejo TREX integra los procesos de biogénesis y exportación de mRNAs (Revisado en Köhler et al. (Köhler & Hurt, 2007)). Hasta el momento se sabe que la exportación de mRNAs virales es independiente de CRM1 (Elton et al, 2001), es dependiente de la actividad de la RNPII excepto para los mRNAs de NEP y NP (Amorim et al, 2007), y están implicadas las proteínas NS1 y TAP/p15 (Wang et al, 2008). Sin embargo, NS1 inhibe la exportación de mRNAs a través del secuestro de TAP-p15 (Satterly et al, 2007), por lo que seguramente NS1 ejerce distintas funciones reguladoras a distintos tiempos de infección. El hecho de que mRNAs virales que no contienen intrones puedan interactuar con el complejo de exportación TAP-p15 es sorprendente porque no son accesibles a la maquinaria de *splicing* celular que posteriormente se asocia a TAP-p15. Sin embargo otros virus utilizan la misma vía de exportación. HSV exporta sus mRNA sin intrones mediante la interacción de TAP-p15 con el factor viral ICP27 (Sandri-Goldin, 2004), y los retrovirus tipo D exportan sus mRNAs a través de una secuencia en *cis* muy estructurada (CTE) a la que se une TAP-p15 (Sandri-Goldin, 2004). Los mRNAs de HIV que contienen intrones son exportados gracias a la vía RRE-Rev-CRM1 en la que la proteína DDX3 es esencial (Yedavalli et al, 2004). Sin embargo, parece que en gripe DDX3 no tiene un papel en la exportación de mRNAs ya que su ausencia no altera los niveles de expresión de las proteínas virales (Figura R19). DDX3 interacciona con el factor TAP y regula la traducción de mRNAs que contienen un extremo 5'UTR largo o estructurado (Lai et al, 2008), por lo que podría estar implicada en la exportación o traducción de mRNAs virales sin ser esencial, y aunque estos no cumplan dichas condiciones. SFPQ, DDX5, hnRNPM y hnRNPH1 podrían ejercer un papel de proteínas coordinadoras entre los complejos de *splicing*





**Figura D1. Asociación entre la polimerasa viral y los complejos de RNPs celulares.** Los mRNAs celulares están protegidos a lo largo de todo su procesamiento por proteínas que conforman las RNPs. La composición de estas RNPs es variable según el punto de procesamiento en el que se encuentre el RNA y según su destino celular. En el diagrama se muestra en líneas generales el procesamiento y exportación de un mRNA celular. A la derecha se muestran los factores celulares identificados en esta Tesis asociados a la polimerasa viral, los cuales podrían ejercer de proteínas adaptadoras entre el complejo viral y el procesamiento post-transcripcional y exportación celular.

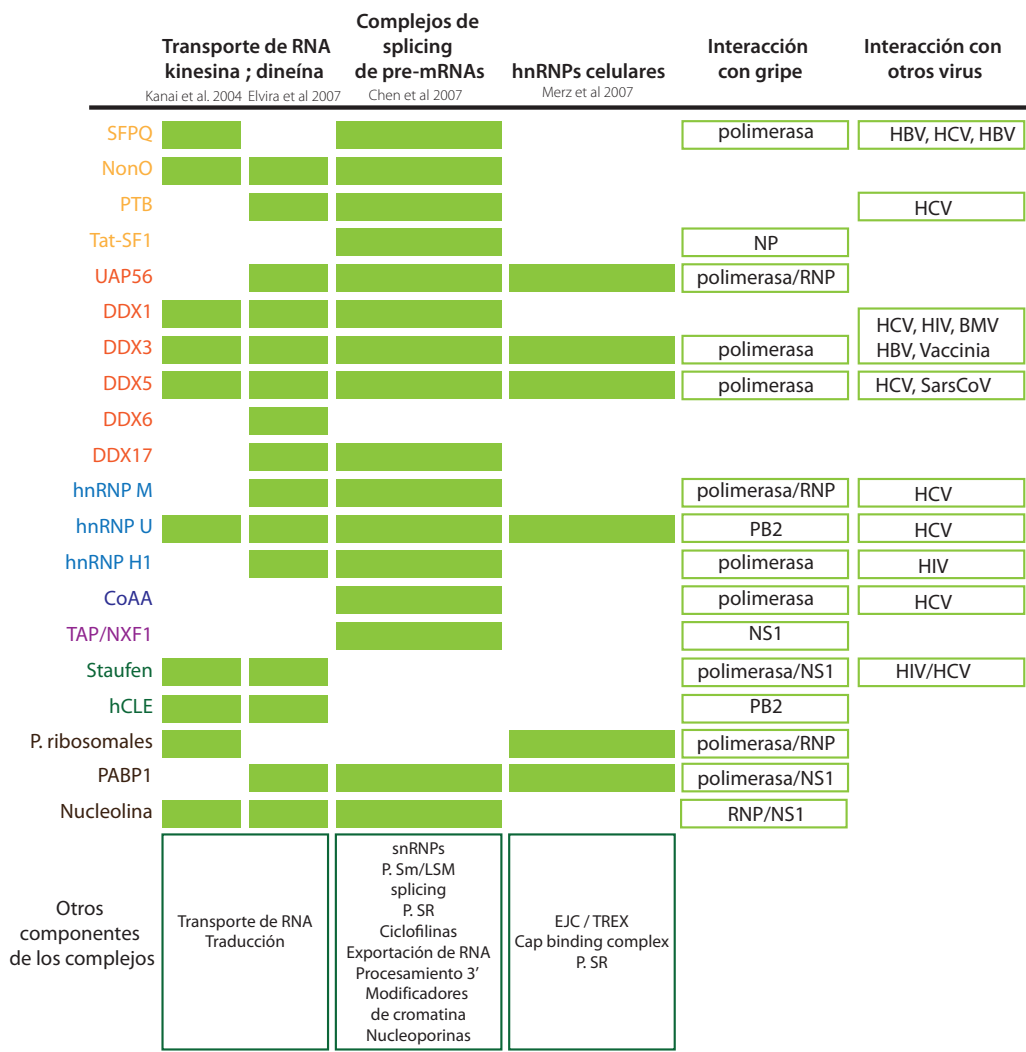
y exportación ya que muchas de ellas se han encontrado formando parte del splicesoma, de gránulos de transporte de RNA y de mRNPs (Chen et al, 2007; Elvira et al, 2006; Kanai et al, 2004; Merz et al, 2007) (Figura D1).

Muchos de los factores identificados en esta Tesis están presentes en varios complejos implicados en el metabolismo de RNA (Figura D2). Esto podría apuntar a que no todos tienen una función específica durante el ciclo viral, siendo posible que algunas tengan únicamente una función adaptadora para

posicionar al complejo viral en regiones con enriquecimiento de ciertos factores celulares. Además, si se analizan los factores que en otros trabajos se han identificado asociados a proteínas virales como Staufen (Falcón et al, 1999) (S. de Lucas, datos no publicados), hCLE (Huarte et al, 2001), UAP56 (Momose et al, 2001) y proteínas ribosomales (Mayer et al, 2007) entre otras, se observa que también forman parte de los complejos descritos (Figura D2). De hecho, proteínas virales de HIV, HCV entre otros, interaccionan con varios de estos factores como se ha comentado en apartados

anteriores (Figura D2), aunque la función que ejercen durante la infección varía dependiendo del virus. La región 3' UTR del RNA del virus de la hepatitis C interacciona con muchos

de los factores descritos en esta memoria, y entre ellos, DDX5 es esencial para la síntesis viral (Harris et al, 2006). Es posible que varios virus se unan a las mismas proteínas para el



**Figura D2. Relación entre las distintas RNPs celulares.** El esquema muestra la composición de tres RNPs celulares distintas implicadas en transporte de RNA y *splicing*. La composición de cada complejo se ha obtenido de un único trabajo. Cabe destacar que la composición puede cambiar entre distintos trabajos. De las RNPs solamente se muestran aquellas proteínas que han sido identificadas asociadas a proteínas virales, y en verde se muestra su presencia en cada uno de los complejos. A la derecha de cada factor se indica a qué proteínas de gripe se asocia, y con qué otros virus interacciona. Los factores celulares se han coloreado según su función: en naranja factores de *splicing*, en rojo helicases, en azul claro proteínas de unión a RNA (hnRNPs), en verde proteínas de transporte de RNA, en violeta componentes de la maquinaria de exportación nuclear, y en negro proteínas ribosomales y otras funciones.

Elvira G et al. (2006) Mol Cell Proteomics 5, 635-651.  
 Kanai Y, Dohmae N, & Hirokawa N (2004) Neuron 43, 513-525.  
 Chen YI et al. (2007) Nucleic Acids Res 35, 3928-3944.  
 Merz C et al. (2007) Rna 13, 116-128.



acercamiento a complejos celulares. Cabe destacar que los mRNAs celulares están en forma de mRNPs cuya composición varía a lo largo de todo su recorrido y según su destino celular, por lo que gripe podría unirse preferencialmente a unas u otras. Por ejemplo, los complejos que contienen DDX1 y DDX3 van asociados a ribosomas mientras que los formados por DDX1 y hCLE no los llevan (Miller et al, 2009).

Es muy probable que muchas de las proteínas identificadas solo tengan un papel adaptador, lo que explicaría que su ausencia no afecte al ciclo viral. El factor SFPQ sí parece ser esencial, por lo que habrá que realizar más estudios para revelar su función durante el ciclo de infección viral.

### 2.3. Traducción celular versus traducción viral

Los mRNAs virales son indistinguibles de los celulares aunque su procesamiento post-transcripcional sea mediado por mecanismos distintos. Durante la infección los mRNAs del virus son traducidos de manera preferencial a los celulares (Garfinkel & Katze, 1993) y se ha sugerido que la proteína NS1 tiene un papel en el incremento traduccional (de la Luna et al, 1995; Enami et al, 1994). Se ha propuesto que NS1, gracias a su interacción con eIF4G (Aragón et al, 2000) y a PABP1 (Burgui et al, 2003), y con la secuencia 5' de los mRNAs virales (Garfinkel & Katze, 1993; Park & Katze, 1995), podría estimular la traducción viral favoreciendo la circularización de los mensajeros. Se han identificado factores celulares que estimulan también la traducción de los mRNAs virales mediante su interacción con la secuencia 5', el autoantígeno La (Park & Katze, 1995) y el factor GRSF-1 (Kash et al, 2002; Park et al, 1999). Se ha propuesto que la polimerasa viral podría favorecer la traducción de los mRNAs virales ya que se une a complejos de iniciación (a eIF4G) y la traducción viral es independiente de

eIF4E (Burgui et al, 2007). Nuestros resultados estarían a favor de esta propuesta ya que se ha encontrado la subunidad S3 del complejo 40S del ribosoma asociado a la polimerasa (Figura R7). Sin embargo en un trabajo realizado junto con R. Coloma, hemos mostrado que en células transfectadas directamente con RNPs, la traducción del mensajero viral no presenta diferencias en ausencia o presencia del complejo de la polimerasa viral soluble.

La proteína DDX3, además de regular la traducción de ciertos mRNAs celulares (Lai et al, 2008), inhibe la traducción dependiente de *cap* y favorece la entrada del ribosoma en las secuencias IREs de los mRNAs de HCV (Shih et al, 2008). Este factor se ha detectado asociado a los complejos de iniciación de la traducción y está presente en gránulos de estrés donde la traducción está reprimida (Lai et al, 2008). Durante la infección viral, la ausencia de DDX3 no afecta en absoluto la viabilidad viral (Figura F17-19). Sin embargo, su sobre-expresión produce un ligero retraso en la acumulación de proteínas virales (Figura F22), lo que estaría de acuerdo con su papel represor de la traducción dependiente de *cap*, pero en desacuerdo con la traducción viral independiente de eIF4E (Burgui et al, 2007). De todos modos la reducción de expresión viral es muy leve, por lo que habrá que analizar en detalle el papel de DDX3 en este proceso. DDX3 podría tener un papel de la represión de la traducción de los mRNAs celulares durante la infección contribuyendo al fenómeno de *shut-off*.

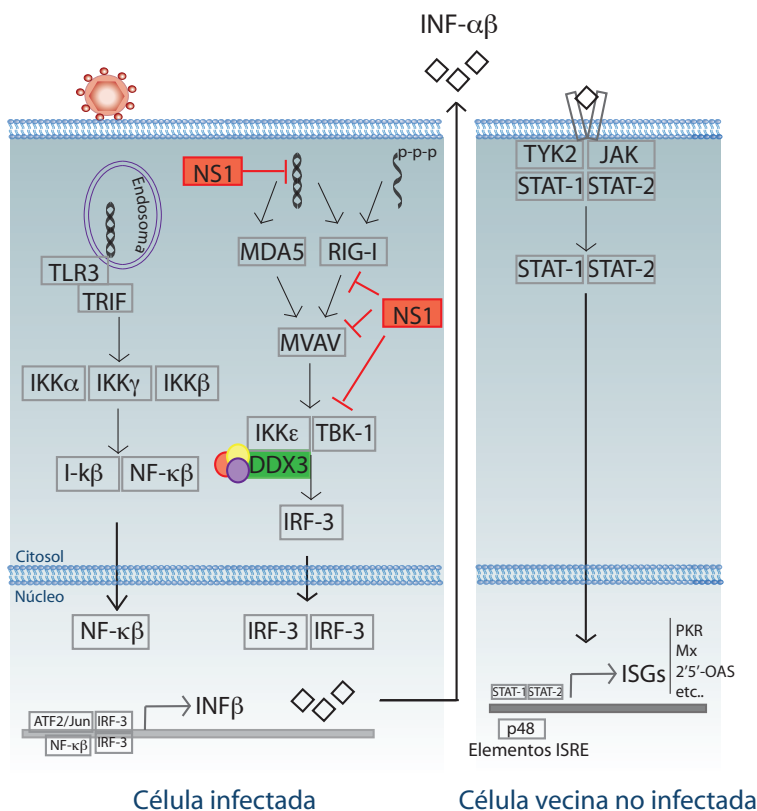
En un futuro habrá que analizar en profundidad la síntesis viral, la exportación y traducibilidad de mRNAs virales en ausencia de los factores identificados asociados a la polimerasa del virus para conocer la implicación de los mismos durante el ciclo de infección.

### 3. DDX3 PODRÍA ESTAR IMPLICADA EN LA EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA

La respuesta inmune innata frente a los virus depende del reconocimiento de los agentes patógenos por parte de moléculas llamadas PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Los PRRs son sensores que reconocen RNA de cadena doble (dsRNA) producto de la replicación viral, como TLR-3, RIG-I y MDA-5 (revisado en Goutagny et al, 2006). Recientemente se ha descrito que RIG-I puede reconocer RNAs de cadena simple que contienen un trifosfato 5'-terminal (ssRNA) (Pichlmair et al, 2006), o una combinación de ambas (Myong et al, 2009). Estas moléculas interactúan con proteínas adaptadores para la transducción de la señal (TRIF, MAVS, TBK1, IKK $\epsilon$ , etc.). Se activan entonces factores de transcripción como NF $\kappa$ B, ATF-2/c-Jun, IRF3 y/o IRF7, que estimulan la transcripción de genes del sistema interferón-

$\alpha\beta$  (INF). Las células secretan INF al medio, se activan las vías JAK/STAT tanto en las células infectadas como en las adyacentes no infectadas, y tras la expresión de genes inducidos por INF (llamados ISGs), las células entran en un estado antiviral (Figura D3). NS1, como se ha comentado en la Introducción, tiene un papel como antagonista de la respuesta antiviral. NS1 secuestra dsRNA (Talon et al, 2000), interacciona con RIG-I (Mibayashi et al, 2007; Pichlmair et al, 2006), e interfiere la cascada de señalización a nivel de RIG-I, TPK-1 y MAVS (Guo et al, 2006; Mibayashi et al, 2007; Opitz et al, 2007). Además, NS1 interfiere la actividad de PKR (Bergmann et al, 2000; Katze et al, 1986; Lee et al, 1994) y la vía 2'-5' OAS/RNaseL (Min & Krug, 2006).

Recientemente se ha descrito que DDX3 está implicada en la expresión de INF $\beta$  mediante la activación de IRF (*Interferon Regulatory Factor*) a través de la activación de los adapta-



**Figura D3. Diagrama de la cascada de señalización para la expresión de INF e inducción del estado antiviral de las células.** El esquema muestra los puntos de la cascada en los que la proteína viral NS1 interfiere para la inhibición de la expresión de INF. Se representa también la interacción del factor DDX3 con la vía del INF, y la posible inhibición de la cascada mediante la interacción de la polimerasa viral.

dores TBK1 y IKK $\epsilon$  (Schroder et al, 2008). De hecho DDX3 interacciona con IKK $\epsilon$ . El papel de DDX3 en la activación de IRF todavía no se conoce. Sin embargo, la proteína viral K7 de Vaccinia secuestra DDX3 para dar lugar a la inhibición de la respuesta INF (Schroder et al, 2008). Sería muy interesante saber si la polimerasa del virus de la gripe interacciona con DDX3 para llevar a cabo la misma inhibición que Vaccinia. El silenciamiento de DDX3 en nuestros ensayos no es total, tal y como ocurre en otros trabajos, dada la gran cantidad de proteína en la célula y debido a su estabilidad (Schroder et al, 2008; Yedavalli et al, 2004). Sin embargo, el crecimiento del virus en ausencia parcial de DDX3 es ligeramente mayor que en presencia del factor (Figura R17). Habría que realizar infecciones virales en un sistema *ddx3*<sup>-/-</sup> para ver la cinética de crecimiento del virus y la capacidad de activación del sistema INF en comparación con células *ddx3*<sup>+/+</sup>. Si la interacción de la polimerasa con DDX3 durante la infección fuera únicamente para evitar la expresión INF (Figura D3), explicaría el crecimiento normal del virus en ausencia parcial de este factor (Figura R17).

#### 4. ¿PUEDEN SER LAS INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS VIRALES Y CELULARES UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA?

Los virus están en constante co-evolución con las células hospedadoras para evadir la respuesta antiviral. Los virus de la gripe, como todos los virus con genoma RNA, tienen una alta variabilidad de secuencia y es por ello que conforman una cuasiespecie viral (Domingo et al, 2006; Ortín et al, 1980). Esta alta variabilidad confiere una capacidad de reacción a los virus frente a cambios en el ambiente. Por ello, la vacunación no es una estrategia con éxito para controlar enfermedades provocadas por HIV, HCV y gripe entre otros, ya que constante-

mente aparecen virus resistentes. Actualmente hay varias vacunas autorizadas en España para su comercialización. Son todas vacunas inactivadas, que se revisan anualmente, y están basadas en virus lisados o en antígenos purificados. Pero estas vacunas no servirían para la prevención de una nueva pandemia. Existen también cuatro antivirales, que son compuestos químicos capaces de neutralizar alguna función del virus. Son la rimantidina y amantadina, que inhiben la función del canal iónico M2, y zanamivir y oseltamivir, que inhiben la función de NA. En respuesta a los antivirales también aparecen cepas resistentes.

Las dianas antivirales pueden ser clasificadas en tres grupos:

a) *Proteínas virales como diana antiviral.* Existen los antivirales que inhiben las proteínas NA y M2, comentados anteriormente. A pesar de ser potentes inhibidores del ciclo viral tienen la desventaja de que aparecen rápidamente cepas resistentes.

b) *Proteínas celulares como diana antiviral.* La inhibición de factores celulares que sean esenciales para la replicación viral y dispensables para la viabilidad celular es una estrategia muy atractiva. La inhibición de un factor celular reduce mucho el riesgo de aparición de cepas resistentes, sin embargo tiene el inconveniente de que probablemente presente toxicidad en el organismo. La vía de señalización de NF- $\kappa$ B se ha propuesto recientemente como posible diana antiviral de gripe (Ludwig & Planz, 2008). El virus de la gripe es capaz de re-dirigir la actividad antiviral de NF- $\kappa$ B hacia una función potenciadora de la infección viral. Esta función es llevada a cabo gracias a dos mecanismos: i) Una de las consecuencias de la vía NF- $\kappa$ B es la activación de caspasas a través de FasL y TRAIL. Las caspasas degradan, entre otras proteínas, las que conforman el poro nuclear y provocan una mayor fluidez en el transporte núcleo-citosol (Kramer et al,

2008; Mazur et al, 2007). Este fenómeno beneficia al virus ya que se favorece la salida de vRNPs al citosol, y por tanto, la infectividad viral (Mazur et al, 2007). ii) El virus induce la expresión de un inhibidor de la respuesta INF tipo I, SOCS-3 (Pauli et al, 2008). Esto le permite inhibir la respuesta antiviral. El antiviral que inhibe la vía NF- $\kappa$ B es el ácido acetil salicílico (ASA), también conocido como Aspirina. Se ha observado que bloquea la replicación viral *in vitro*, dado que reduce la expresión de FasL y TRAIL, no es tóxica para las células y no genera resistentes. Además, tiene efecto antiviral en ratones infectados con gripe (Mazur et al, 2007). Una buena estrategia para la búsqueda de moléculas antivirales de este grupo es el análisis de fármacos comercializados, dado que se conocen los niveles de toxicidad para el organismo.

c) *Interacción de proteínas virales y celulares como diana antiviral.* Inhibir una interacción es también una estrategia que podría ser eficaz, y con bajo riesgo de toxicidad. Sin embargo, al igual que con la primera estrategia, el virus podría ser capaz de adquirir mutaciones para evadir el efecto antiviral. La interacción entre dos proteínas puede abarcar dominios conformados por muchos aminoácidos, por tanto las moléculas antivirales deberían ser péptidos de gran tamaño. El péptido aislado es rápidamente degradado en el entorno celular, por lo que debería estar asociado a moléculas que lo protegieran y que además favorecieran su internalización en las células. Es por ello que no resulta una estrategia sencilla. Un ejemplo de este caso sería el descrito por Twu y cols. en el que se inhibe la interacción de NS1 con el factor celular CPSF-1 (Twu et al, 2006). La proteína NS1 interacciona con CPSF30 para inhibir el procesamiento 3' de los mRNAs celulares y por tanto, inhibir la expresión de proteínas activadas por INF $\beta$ . En cultivos celulares, la expresión de un fragmento de la proteína CPSF30 responsable de la interacción con NS1

es capaz de reducir el crecimiento viral hasta unas 60 veces. Sin embargo, han observado la aparición de virus resistentes.

De las proteínas identificadas en esta Memoria, tanto SFPQ y las importinas, como su interacción con factores virales, podrían ser dianas antivirales. Sin embargo, la inhibición de estas proteínas seguramente no sería una buena estrategia dado que ambas tienen funciones relevantes en la célula y seguramente la ausencia de su función produciría un efecto tóxico en el organismo. Sin embargo, el diseño de moléculas que inhibieran la interacción con factores virales podría ser una buena estrategia, aunque la resistencia viral seguiría siendo un problema de difícil solución.

## 5. IMPORTINAS: NUEVOS DETERMINANTES DE RANGO DE HOSPEDADOR

La subunidad PB2 es esencial para la replicación y para la transcripción viral (Gastaminza et al, 2003; Lee et al, 2002; Perales & Ortín, 1997), y además su gen es relevante para la determinación de rango de hospedador (Almond, 1977; Finkelstein et al, 2007; Gabriel et al, 2005; Labadie et al, 2007; Li et al, 2005b; Subbarao et al, 1993). Por ello se decidió analizar los factores asociados a esta subunidad tal y como se había realizado con la polimerasa viral, con la etiqueta TAP. Uno de los factores identificados asociados a PB2 es la importina  $\alpha$ 5, resultado no sorprendente ya que esta subunidad contiene una señal de localización nuclear (NLS) bipartita comprendida entre los residuos 736-759 (Mukaigawa & Nayak, 1991). Además el dominio C-terminal de la proteína se había co-cristalizado junto con la importina  $\alpha$ 5 (Tarendeau et al, 2007). Sin embargo, lo sorprendente fue la estabilidad del complejo PB2TAP-importina  $\alpha$ 5 (Figura F25). Tarendeau et al. observaron que un dominio de PB2 que contenía mutaciones en la NLS no era capaz

de localizar correctamente en el núcleo de la célula, lo que correlacionaba con la incapacidad de interaccionar con la importina  $\alpha 5$  (Tarendeau et al, 2007). En un trabajo conjunto con Patricia Resa-Infante observamos que la actividad de RNPs que contenían mutaciones en la NLS de PB2 se reducía progresivamente, en paralelo con la reducción de la capacidad de interacción con la importina (Resa-Infante et al, 2008; Tarendeau et al, 2007). El rescate de la localización nuclear de los mutantes de PB2 mediante la inserción de una NLS ectópica del antígeno T de SV40 no recuperó la actividad de las RNPs, por lo que se sugirió que las importinas, además de ejercer una función de importación nuclear, tenían un papel en la replicación viral, probablemente actuando como co-factor viral. Gabriel et al. observaron que virus aviares adaptados a ratón presentaban mutaciones en PB2 que incrementaban tanto la actividad de la polimerasa viral como la capacidad de interacción con la importina  $\alpha 1$  en células humanas, fenómeno que no ocurría en células aviares (Gabriel et al, 2005; Gabriel et al, 2008). Las importinas  $\alpha 1$  y  $\alpha 5$  son bastante distintas, aunque los residuos implicados en la interacción con PB2 son muy conservados (Gabriel et al, 2008), por lo que los trabajos con ambas importinas, junto con los presentados en esta Memoria, apuntan a que las importinas juegan un papel importante en el ciclo viral. La subunidad PB2 de origen humano es capaz de interaccionar con varias isoformas de importinas humanas (Figura R26), mientras que la misma subunidad de origen aviar sólo es capaz de interaccionar parcialmente con la importina  $\alpha 1$  (Figura F27). Estos resultados sugieren que la interacción de PB2 con importinas es específica de especie, por lo que podría ser un factor determinante de rango de hospedador. Cabe destacar que todas las subunidades de PB2 procedentes de distintas cepas aviares y humanas analizadas tienen la región de la NLS idéntica, por lo que se supone que otras regiones de PB2 estarían implicadas

en dicha interacción. De las mutaciones analizadas indicadas en la Figura F27, algunas son próximas a la región NLS en la secuencia primaria. Sin embargo hay otras que están a mucha distancia de la señal NLS, aunque algunas de ellas están cerca en la estructura tridimensional (Tarendeau et al, 2007). Por ejemplo, el residuo 701, cuya mutación D701N está implicada en la asociación con la importina  $\alpha 1$  (Gabriel et al, 2008) y en patogenicidad (Gabriel et al, 2005), se encuentra formando un enlace con el residuo 753 en ausencia de la importina. Sin embargo, para que dicha interacción pueda ocurrir, el enlace de ambos residuos debe romperse. Se cree que mutaciones en el residuo 701 estarían afectando la estructura de PB2 e impidiendo la asociación. Habrá que realizar estudios con más profundidad para conocer la función que ejercen las importinas durante la síntesis viral, así como el dominio de PB2 responsable de la interacción a parte de la NLS. Cabe destacar que la polimerasa viral no co-purifica con las importinas (datos no mostrados).

## NUEVO MODELO DE LOS PROCESOS DE REPLICACIÓN VIRAL

### 6. OLIGOMERIZACIÓN DE LA POLIMERASA VIRAL *IN VIVO*

Muchos virus con genoma RNA han adoptado estrategias para una mayor eficiencia de la síntesis del RNA viral. Uno de los casos mejor estudiados es la polimerasa de Poliovirus. El complejo forma oligómeros que permiten que la unión del RNA (Beckman & Kirkegaard, 1998; Pata et al, 1995) y la elongación del RNA sean de modo cooperativo (Hobson et al, 2001; Pata et al, 1995). Además esta oligomerización permite la formación de grandes estructuras en dos dimensiones que actúan

como una malla catalítica (Lyle et al, 2002) y permite, entre otras cosas, el incremento de la afinidad por los sustratos y la retención de los productos para reacciones secuenciales. En virus RNA este último fenómeno puede ser muy relevante ya que el producto de una primera ronda de replicación sirve como molde para la siguiente. Como se ha comentado en la Introducción, se ha descrito el fenómeno de oligomerización de los complejos virales tanto en virus RNA de banda positiva como negativa, y en varios de ellos se ha observado que gracias a este fenómeno la síntesis de RNA es cooperativa. A lo largo de esta Memoria se ha demostrado que la polimerasa del virus de la gripe también es capaz de formar oligómeros intracelularmente. En ensayos de filtración en gel de complejos de polimerasa viral recombinante se observa que se forman agregados de tamaños equivalentes a dímeros y trímeros del heterotrímero (Figura F28). Además, mediante la purificación de complejos con etiquetas alternativas en la misma subunidad, también se puede observar la interacción entre polimerasas, que es independientemente de la localización de la etiqueta (Figura F30). La interacción podría ser mediada por las proteínas PB1 y/o PB2 (Figura F33), aunque no se puede descartar que factores celulares tengan un papel en la oligomerización, y se descarta PA como mediador. Estos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores realizados en oocitos de *Xenopus* en los que se observó que PB1 y PB2 expresadas independientemente no se comportan como monómeros, a diferencia de PA que sí lo hace (Digard et al, 1989).

La interacción entre polimerasas podría facilitar la asociación de las distintas RNPs durante el proceso de encapsidación de las RNPs en los nuevos viriones. Se sabe que secuencias en los extremos del vRNA son responsables de la selección y del correcto empaquetamiento de las 8 RNPs (Muramoto et al, 2006), pero se desconoce el mecanismo que lo lleva a cabo.

Las interacciones entre complejos de polimerasas podrían tener un papel en este fenómeno. De hecho se ha descrito que mutaciones en la subunidad PA dan lugar a la incapacidad de formar viriones a pesar de la correcta expresión de los RNAs virales, por lo que se ha implicado a PA en la morfogénesis viral (Regan et al, 2006). La posible implicación del fenómeno de oligomerización durante la replicación viral se discutirá más adelante.

## 7. COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* ENTRE POLIMERASAS DURANTE LA REPLICACIÓN VIRAL

La polimerasa del virus es responsable tanto de la replicación como de la transcripción del RNA genómico. Se cree se produce un cambio de síntesis transcriptita a replicativa, y hay varios modelos que lo intentan explicar, como se ha comentado en la Introducción. Tampoco se conocía hasta el momento si la síntesis viral es llevada a cabo por la polimerasa que forma parte de la RNP o bien por otra soluble. Se decidió entonces estudiar genéticamente la replicación viral. Se disponía de un sistema recombinante de replicación y transcripción, y de mutantes de la polimerasa bien caracterizados, lo que nos permitió realizar varias preguntas sobre la replicación y la transcripción viral. Dado que la polimerasa del virus es un complejo heterotrimérico, los mutantes analizados debían de estar todos en la misma subunidad. Se disponía de mutantes en la subunidad PB2 que afectaban únicamente a uno de los dos procesos: replicación o transcripción. P. Gastaminza en el laboratorio describió mutantes de PB2 que no eran capaces de replicar correctamente, sin embargo transcribían de modo normal (Gastaminza et al, 2003). Por otro lado, R. Coloma y cols., también en el laboratorio, describieron mutantes en PB2 que tenían alterada la capacidad de unión a estructuras *cap* y por tanto transcribían de ma-



nera ineficiente, mientras que podían replicar normalmente (Guilligay et al, 2008). Estos mutantes nos permitieron realizar experimentos de complementación intragénica que dieron respuesta a las preguntas concretas que nos realizamos.

### 7.1 ¿Puede una polimerasa complementar a otra defectiva en replicación?

Para contestar esta pregunta se reconstituyeron RNPs recombinantes con una mezcla de polimerasas mutantes en replicación, y mutantes en transcripción que tenían la función de replicación intacta (Figura R34). Se utilizaron mutantes en transcripción para poder distinguir fenotípicamente ambas poblaciones de RNPs. Además, se añadió una etiqueta de histidinas sólo a la subunidad PB2 mutante en replicación para poder analizar la acumulación de RNPs tras el ensayo de complementación. Como se muestra en las Figuras F35 y F36, se observó un fenómeno de complementación intragénica ya que una polimerasa deficiente en replicación fue capaz de incorporarse en las nuevas RNPs sintetizadas. Este resultado está de acuerdo con trabajos muy antiguos realizados con virus termosensibles (ts). Varios grupos obtuvieron virus ts que contenían mutaciones en un único segmento. Mediante coinfecciones con virus ts mutantes en el mismo segmento fueron capaces de obtener producción viral, por lo que concluyeron que ocurría una complementación intragénica (Revisado en Mahy, 1983). En concreto, observaron este fenómeno en los segmentos de PA y de PB1 (Heller & Scholtissek, 1980; Massicot et al, 1982). Como se ha comentado en la Introducción, también se observó complementación intragénica de los segmentos de NP, NA y NS. La posterior observación de que estos segmentos codifican proteínas que oligomerizan intracelularmente explicó el fenómeno de complementación. Sin embargo, hasta el

momento no se sabía la razón por la que los segmentos de la polimerasa eran capaces de complementar. Varios resultados presentados en esta Memoria podrían explicarlo: la oligomerización del complejo de la polimerasa (Figuras R28 y R33) y la complementación intragénica en el sistema de un minireplicón viral (Figuras R35-43).

### 7.2 Una polimerasa distinta a la que sintetiza el RNA encapsida el RNA de nueva síntesis

Los resultados observados en las Figuras F35 y F36 también sugieren que una polimerasa distinta de la que replica es capaz de encapsidar los RNAs sintetizados para la generación de las RNPs progenie. En este ensayo, la única opción para la obtención de RNPs-His mutantes en replicación sería que la polimerasa mutante en transcripción llevara a cabo la síntesis viral, y que la polimerasa mutante en replicación encapsidara el nuevo RNA. En este sentido, la probabilidad de que un nuevo RNA fuera encapsidado por una u otra polimerasa sería del 50%, y de hecho, es el resultado que se observó en la Figura R36. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Vreede y cols., que observaron que la síntesis del cRNA es dependiente de la presencia de la polimerasa soluble, y en concreto de su capacidad de interacción con el RNA. El complejo soluble interacciona con el cRNA de nueva síntesis, lo estabiliza e inhibe su degradación (Vreede et al, 2004), y en un trabajo posterior observaron que el complejo soluble interacciona con el cRNA completo (Vreede & Brownlee, 2007). Estos autores trabajaron con vRNPs y estudiaron el paso de replicación de vRNA a cRNA ya que inhiben el paso de cRNA a vRNA (mediante el tratamiento de las células con cicloheximida y una polimerasa soluble incapaz de replicar). Sin embargo, en nuestro trabajo se analiza la acumulación final de RNPs, que fundamentalmente son vRNPs (Figura R43).

Por tanto, nuestro resultado aporta un dato adicional al de Vreede y cols., y es que el RNA progenie también es encapsidado por una polimerasa soluble distinta de la replicativa.

### 7.3. Una polimerasa distinta a la residente en la RNP es responsable de la síntesis viral

Resultaba muy interesante saber si la polimerasa que formaba parte de la RNP era la responsable de la síntesis viral, o si por el contrario, era otra distinta. En este caso se transfectó una RNP con una polimerasa incapaz de replicar en células que expresaban la polimerasa mutante en transcripción, y se analizó la acumulación de RNPs progenie como medida de replicación. El ensayo presentado en las Figuras R40 y R42 sugiere que una polimerasa en *trans* es responsable de la síntesis viral y de la encapsidación del RNA sintetizado en el paso de cRNA a vRNA (Figura R43). Para el análisis del paso de cRNA a vRNA, la condición ideal hubiera sido transfectar directamente cRNPs, pero no es posible por varios motivos: a) Durante la infección la síntesis de cRNA es muy minoritaria frente a la de vRNA ; b) No se pueden separar las poblaciones de cRNPs y de vRNPs ya que son fenotípicamente indistinguibles. Los resultados mostrados en la Figura R43 sugieren que la replicación del vRNA a cRNA es en *trans* dado que una RNP deficiente en replicación fue capaz de generar cRNA sólo en presencia de una polimerasa soluble con dicha función intacta. Del mismo modo, una RNP mutante en transcripción capaz de replicar presenta niveles muy bajos de cRNA en presencia de la polimerasa soluble deficiente en replicación.

Volviendo a los resultados de Vreede y cols., ellos observaron que las vRNPs, en presencia de polimerasa soluble, son capaces de sintetizar cRNA. Para impedir que ocurra todo el ciclo de replicación utilizaron una polimerasa soluble mutante en el sitio catalítico de PB1, por

lo que no es capaz de sintetizar RNA (Vreede & Brownlee, 2007; Vreede et al, 2004). A pesar de que la polimerasa soluble es incapaz de replicar, se detecta cierta cantidad de cRNA, por lo que no se puede descartar que la replicación de vRNA a cRNA pueda en parte ocurrir en *cis*. Dado que nuestros resultados sugieren que todo el proceso de replicación ocurre en *trans*, sería muy interesante profundizar en el estudio de este mecanismo. Las implicaciones del modelo presentado durante la infección viral se discuten a continuación.

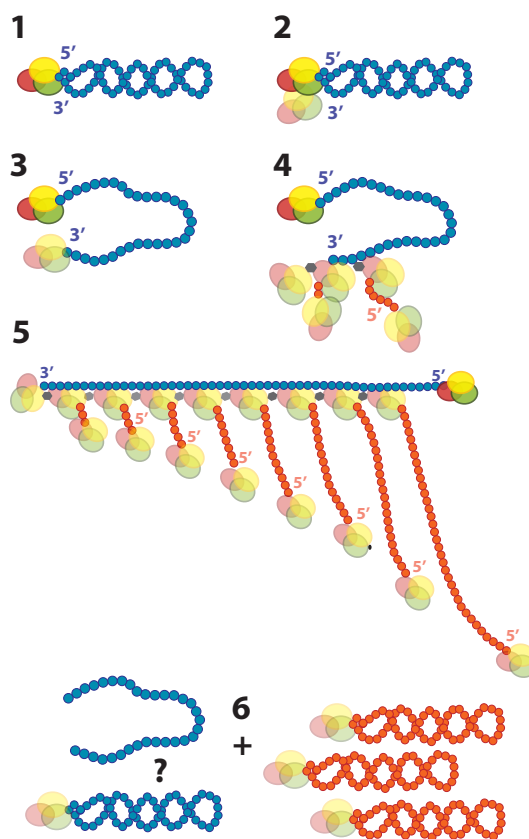
## 8. NUEVO MODELO DE REPLICACIÓN VIRAL

Se propone un nuevo modelo de replicación del RNA progenie basado en los resultados presentados en esta Tesis, que se muestra en la Figura D4. En un primer paso una polimerasa soluble debe entrar a formar parte del complejo cRNP. Para el inicio de la replicación, la polimerasa no residente en la RNP debe tener acceso al extremo 3' del cRNA para empezar la síntesis viral (Figura D4-2 y D4-3). Este paso podría estar mediado por la interacción entre polimerasas descrita en esta Memoria (Figura R33), aunque no se descarta que pueda ser por factores celulares. Una vez la polimerasa soluble ha entrado a formar parte de complejo cRNP empieza la síntesis del vRNA. El nuevo RNA es protegido por un complejo soluble de polimerasa distinto del que replica (Figura D4-4), de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura R35. Se ha descrito que la subunidad PB1 de la polimerasa tiene una gran afinidad por el extremo 5' del RNA (González & Ortín, 1999a), por lo que este reconocimiento sería factible. Una vez unido el complejo al extremo 5', el nuevo RNA ha de ser protegido por moléculas de NP. La incorporación de sucesivas moléculas de NP estaría controlada por interacciones NP-polimerasa (Biswas et al, 1998), que se ha observado que son esen-



ciales para la replicación viral (Labadie et al, 2007; Poole et al, 2004), del mismo modo que la oligomerización de moléculas de NP (Ye et al, 2006). Una opción muy atractiva sería que mediante la oligomerización de la polimerasa se formara una plataforma de replicación que fuera fija, como se muestra en las Figuras D4-5 y D5. La interacción de varios complejos de polimerasa podrían formar una estructura por la que una sola molécula de cRNA-NP se moviera en dirección 3'-5' y se replicara muy efectivamente gracias a esta disposición. Estas estructuras se han observado en otros virus como Poliovirus (Hobson et al, 2001; Lyle et al, 2002) y HCV (Qin et al, 2002; Wang et al, 2002), y sus polimerasas actúan de modo cooperativo para la síntesis de RNA. En estudios

de los años 70 y 80 se observó que durante la infección viral ocurre una reorganización de estructuras nucleares y una aparición de estructuras tubulares de 40-50µm de diámetro y una longitud variable de hasta 1mm (Revisado en Josset et al, 2008)). La naturaleza de estas estructuras no se ha analizado pero sería muy interesante saber si son proteínas virales o celulares, ya que podrían ser oligómeros de polimerasa. Un paso que queda sin resolver del modelo es cómo la polimerasa que cataliza la síntesis del RNA puede pasar de largo por la señal de poliadenilación y realizar una copia completa del cRNA, ya que el extremo 5' del molde tiene unida la polimerasa paterna. Una opción sería que las polimerasas no residentes que sintetizan el RNA pudieran despla-



**Figura D4. Modelo para la replicación del RNA viral.** Se muestran los sucesivos pasos de la replicación de las cRNPs (en azul) para dar lugar a vRNPs progenie (en naranja). En gris se representa la interacción entre complejos de polimerasas. La polimerasa paterna se representa en colores sólidos mientras que la polimerasa soluble de nueva síntesis se representa en colores semitransparentes.

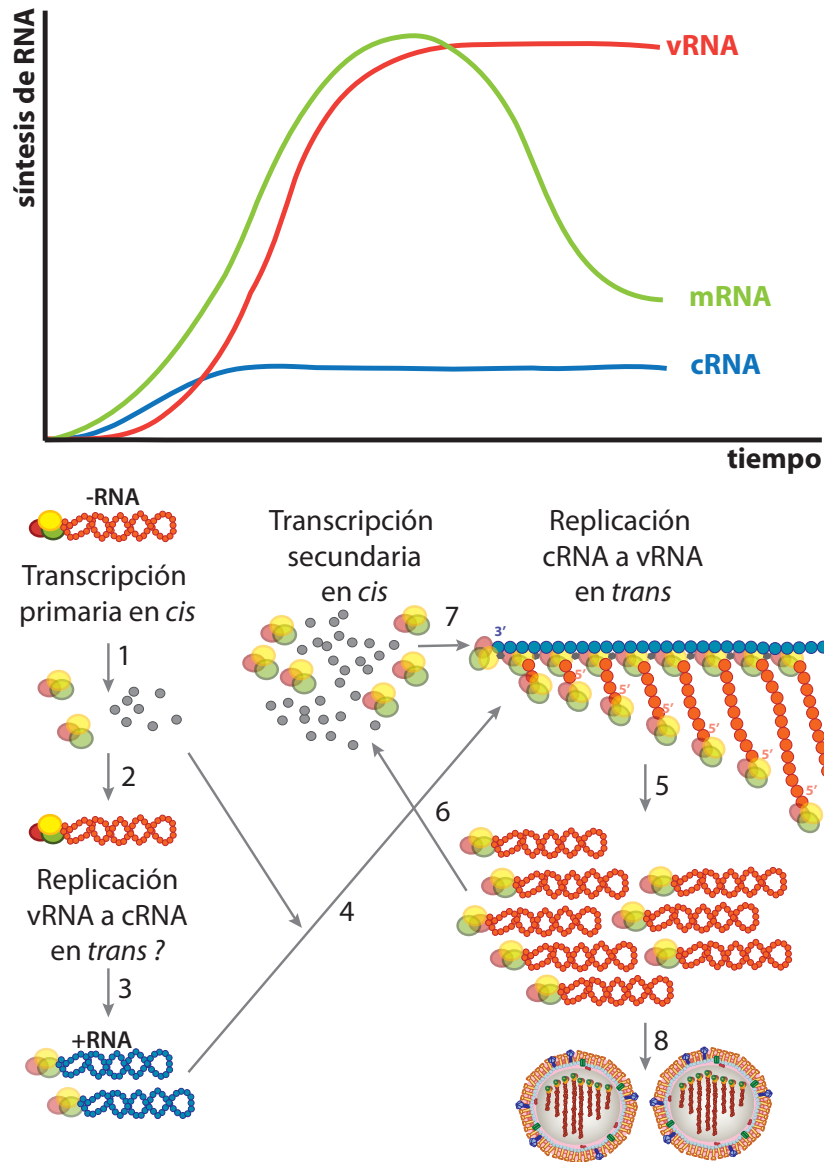
zar y reemplazar sucesivamente la polimerasa residente para la completa copia del molde y además proteger el extremo 5' para evitar su degradación. De modo que habría dos opciones: que el desplazamiento fuera transitorio o bien permanente. Tras la replicación, el RNA paterno en el primer caso estaría encapsidado por una polimerasa, y en el segundo quedaría linearizado (Figura D4-6) (Klumpp et al, 1997). Este modelo sería también posible para la replicación del cRNA a partir del vRNA.

## 9. EL MODELO DE REPLICACIÓN EN *TRANS* EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN VIRAL

Se asume que en el interior de la partícula viral solo se encuentran las 8 RNPs paternas y que no está presente la polimerasa soluble. Una vez el virión entra en la célula hospedadora, las RNPs son dirigidas al núcleo, donde tienen lugar los procesos de replicación y transcripción viral. Las vRNPs pueden sintetizar el mRNA en *cis* (resultados no mostrados realizados en colaboración con R. Coloma), por lo que la transcripción primaria ocurre en primer lugar (Figura D6-1). Según Vreede et al. las vRNPs pueden sintetizar también en *cis* el cRNA, sin embargo necesitan la presencia de la polimerasa viral soluble para su unión y estabilización (Vreede & Brownlee, 2007; Vreede et al, 2004). Tras la transcripción primaria se expresan la polimerasa y NP (Figura D6-2), que ahora entrarán en el ciclo de replicación estabilizando el cRNA de nueva síntesis (Figura D6-3). Sin embargo, a partir de nuestros resultados sugerimos que tras la transcripción primaria, la polimerasa soluble lleva a cabo la replicación de vRNA a cRNA en *trans*. Las cRNPs sirven como molde para sucesivas rondas de replicación en las que se generan vRNPs mediante una replicación en *trans* (Figura D6-4,5). Estas vRNPs servirán como molde para transcripción secundaria

(Figura D6-6,7), por lo que se incrementará la concentración de polimerasa y NP libres que a su vez servirán para la generación de vRNPs progenie (Figura D6-5,8). La síntesis de vRNA es muy superior a la de cRNA y se desconoce el mecanismo que lo regula. Una posible explicación es la replicación en *trans* que se ha discutido en apartados anteriores, ya que a partir de una única molécula de cRNA se generarían múltiples copias de vRNA. En el caso de la síntesis de cRNA, que también podría ser en *trans*, no alcanza los niveles de acumulación del vRNA. La síntesis del cRNA ocurre a tiempos muy tempranos de la infección en un entorno de bajas concentraciones de polimerasa soluble. Esto podría explicar la poca síntesis de cRNA. Además el promotor de cRNA es mucho más potente que el de vRNA. Una vez generadas las vRNPs progenie, éstas podrían servir como molde para la generación de cRNA. Sin embargo se supone que estas vRNPs o bien sirven como molde para la transcripción secundaria o bien son exportadas al citosol para la generación de los viriones. Este modelo explicaría la cinética de acumulación de las distintas especies virales a lo largo de la infección (Figura D6).

Recientemente se ha descrito que la complementación entre proteínas, especialmente cuando son capaces de oligomerizar, es la base de la interferencia viral (Crowder & Kirkegaard, 2005; Perales et al, 2007). La presencia de mutantes dominantes negativos bloquea eficientemente complejos multiproteicos virales. La interferencia debida a dominantes negativos se ha descrito también durante la mutagénesis de una población viral en un proceso conocido como defección letal (Grande-Perez et al, 2005). Se ha propuesto que el estudio de inhibidores negativos podría ser utilizado para la búsqueda de dianas antivirales, ya que virus sensibles a una droga ejercen una inhibición sobre virus resistentes en co-infección (Crowder & Kirkegaard,



**Figura D5. Relación entre la cinética de acumulación de los RNAs virales durante la infección y el modelo de replicación y transcripción.** En la parte superior se representa la cinética de acumulación de los RNAs durante la infección, y en la parte inferior se muestran los procesos de transcripción y replicación llevados a cabo por las RNPs. Se representan las cRNPs en azul, las vRNPs en naranja, NP soluble en gris, la polimerasa paterna en colores sólidos y la polimerasa de nueva síntesis en colores semitransparentes.

2005). Este abordaje tiene la ventaja de que presenta un riesgo muy reducido de aparición de mutantes resistentes a la droga. Dado que las polimerasas de gripe oligomerizan y son capaces de complementar entre ellas, podrían suponer una nueva diana antiviral. De hecho se han descrito varios mutantes dominantes que interfieren con la polimerasa silvestre, que corresponden a las subunidades PB2 (Perales et al, 1996) y PA (Zürcher et al, 1996).

A pesar de que los resultados presentados en esta Memoria aportan nuevos datos sobre los procesos de replicación viral, habrá que esperar a nuevos trabajos que ayuden a entender definitivamente tanto los procesos de replicación y transcripción viral, como su regulación. Del mismo modo, la continuidad del estudio de los factores identificados asociados a la polimerasa viral permitirán, en un futuro, avanzar un poco más en el conocimiento de la estrecha relación que el virus establece con la célula hospedadora para llevar a cabo el ciclo viral.





# CONCLUSIONES







1. Las proteínas SFPQ, DDX3, DDX5, hnRNPM, hnRNPH1, S3, CoAA, NXP2,  $\beta$ -tubulina y ZFP71 han sido identificadas asociadas a la polimerasa viral recombinante.
2. Los niveles de expresión y la localización nuclear de los factores SFPQ, DDX3, DDX5 y hnRNPM no se alteran en presencia del virus. Los factores SFPQ, DDX5, NXP2 y hnRNPM colocalizan en el núcleo con las RNPs a tiempos tempranos durante la infección, mientras que a tiempos tardíos las RNPs colocalizan con DDX3 en el citosol.
3. Los factores DDX3, DDX5 o hnRNPM no contribuyen de manera esencial al ciclo de replicación viral, sin embargo la ausencia de SFPQ altera drásticamente el ciclo de infección viral.
4. Las importinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 7$  se asocian establemente a la subunidad PB2 de la polimerasa viral. La interacción de PB2 con importina  $\alpha$  es dependiente de isoforma y de hospedador.
5. La polimerasa es capaz de formar oligómeros *in vivo* y la interacción podría ser mediada por las subunidades PB1 y/o PB2.
6. Se ha propuesto un nuevo modelo de replicación viral:
  - La polimerasa viral es capaz de complementar en *trans* durante los procesos de replicación de cRNA a vRNA.
  - Una polimerasa distinta a la que sintetiza el RNA viral es responsable de la encapsidación del RNA de nueva síntesis.
  - Una polimerasa distinta de la que constituye la RNP es responsable de la síntesis del vRNA a partir del molde de cRNA.



# BIBLIOGRAFÍA





- Ahlquist P, Noueiry AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT (2003) Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**(15): 8181-8186
- Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Muller CW, Ruigrok RW, Baudin F (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J* **22**(18): 4646-4655
- Almond JW (1977) A single gene determines the host range of influenza virus. *Nature* **270**(5638): 617-618
- Amorim MJ, Read EK, Dalton RM, Medcalf L, Digard P (2007) Nuclear Export of Influenza A Virus mRNAs Requires Ongoing RNA Polymerase II Activity. *Traffic* **8**: 1-11
- Anisimova E, Ghendon Y, Markushin S (1980) Ultrastructural changes in cells induced by temperature-sensitive mutants of fowl plague virus at permissive and non-permissive temperature. *J Gen Virol* **47**(1): 11-18
- Aragón T, de la Luna S, Novoa I, Carrasco L, Ortín J, Nieto A (2000) Translation factor eIF4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**: 6259-6268
- Area E (2003) Modelos tridimensionales de la ribonucleoproteína y la polimerasa recombinantes del virus de la gripe. Universidad Autónoma de Madrid,
- Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 308-313
- Arzt S, Baudin F, Barge A, Timmins P, Burmeister WP, Ruigrok RW (2001) Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology* **279**(2): 439-446
- Asano Y, Ishihama A (1997) Identification of two nucleotide binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem* **122**: 627-634
- Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* **298**(5592): 416-419
- Avalos RT, Yu Z, Nayak DP (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**(4): 2947-2958
- Bae SH, Cheong HK, Lee JH, Cheong C, Kainosho M, Choi BS (2001) Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10602-10607
- Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* **68**(11): 6900-6909
- Barrera I, Schuppli D, Sogo JM, Weber H (1993) Different mechanisms of recognition of bacteriophage Q $\beta$  plus and minus strand RNAs by Q $\beta$  replicase. *J Mol Biol* **232**: 512-521
- Barrett T, Wolstenholme AJ, Mahy BW (1979) Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology* **98**: 211-225
- Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AM, Bourdon JC, Wardrop J, Gregory DJ, Lane DP, Perkins ND, Fuller-Pace FV (2005) The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *Embo J* **24**(3): 543-553
- Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure

- in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**(13): 3158-3165
- Bauer CM, Pinto LH, Cross TA, Lamb RA (1999) The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking. *Virology* **254**(1): 196-209
- Beaton AR, Krug RM (1986) Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6282-6286
- Beckman MT, Kirkegaard K (1998) Site size of cooperative single-stranded RNA binding by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **273**(12): 6724-6730
- Beloso A, Martínez C, Valcárcel J, Fernández-Santarén J, Ortín J (1992) Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J Gen Virol* **73**: 575-581
- Bergmann M, García-Sastre A, Carnero E, Pehamberger H, Wolff K, Palese P, Muster T (2000) Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol* **74**: 6203-6206
- Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**(7): 5493-5501
- Biswas SK, Nayak DP (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**: 1819-1826
- Biswas SK, Nayak DP (1996) Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**(10): 6716-6722
- Blaas D, Patzelt E, Keuchler E (1982) Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl Acids Res* **10**: 4803-4812
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* **72**: 291-336
- Blumenthal T, Carmichael GG (1979) RNA replication: Function and structure of Q $\beta$ -replicase. *Ann Rev Biochem* **48**: 525-548
- Bouloy M, Plotch SJ, Krug RM (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4886-4890
- Brosnan MJ, Chen L, Van Dyke TA, Koretsky AP (1990) Free ADP levels in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. Effects of enzyme activity, phosphagen type, and substrate concentration. *J Biol Chem* **265**(34): 20849-20855
- Brownlee GG, Sharps JL (2002) The RNA polymerase of influenza A virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter. *J Virol* **76**(14): 7103-7113
- Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* **85**(Pt 4): 983-991
- Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR (2000) Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* **74**(4): 1781-1786
- Bukrinskaya AG, Vorkunova GK, Vorkunova NK (1979) Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* **45**(3): 557-567
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**: 37-43

- Burgui I, Aragón T, Ortín J, Nieto A (2003) PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**: 3263-3274
- Burgui I, Yanguez E, Sonenberg N, Nieto A (2007) Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol* **81**(22): 12427-12438
- Camats M, Guil S, Kokolo M, Bach-Elias M (2008) P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS ONE* **3**(8): e2926
- Caputi M, Zahler AM (2002) SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D. *EMBO J* **21**(4): 845-855
- Carette G, Lei EP, Sartorelli V (2007) The DEAD-box p68/p72 proteins and the noncoding RNA steroid receptor activator SRA: eclectic regulators of disparate biological functions. *Cell Cycle* **6**(10): 1172-1176
- Carr SM, Carnero E, Garcia-Sastre A, Brownlee GG, Fodor E (2005) Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology*
- Cevik B, Smallwood S, Moyer SA (2003) The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. *Virology* **313**(2): 525-536
- Chan AY, Vreede FT, Smith M, Engelhardt OG, Fodor E (2006) Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**(1): 210-217
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**(12): 1306-1312
- Chen YI, Moore RE, Ge HY, Young MK, Lee TD, Stevens SW (2007) Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res* **35**(12): 3928-3944
- Chen Z, Li Y, Krug RM (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* **18**(8): 2273-2283
- Cheng A, Wong SM, Yuan YA (2008) Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res*
- Cianci C, Tiley L, Krystal M (1995) Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* **69**: 3995-3999
- Claas EC, Osterhaus AD, van BR, De JJ, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus [see comments]. *Lancet* **351**(9101): 472-477
- Colman PM, Varghese JN, Laver WG (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**(5912): 41-44
- Compans RW, Chopin PW (1975) Reproduction of Myxoviruses. In *Comprehensive Virology*, Fraenkel-Conrat H, Wagner RR (eds), Vol. 4, pp 179-252. New York: Plenum Press
- Compans RW, Content J, Duesberg PH (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **4**: 795-800
- Conenello GM, Zammarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P (2007) A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**(10): 1414-1421

- Cros JF, Garcia-Sastre A, Palese P (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**(3): 205-213
- Crowder S, Kirkegaard K (2005) Trans-dominant inhibition of RNA viral replication can slow growth of drug-resistant viruses. *Nat Genet* **37**(7): 701-709
- de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortín J (1995) Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**: 2427-2433
- Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchev AV, Brownlee GG, Fodor E (2006a) The role of Ran Binding Protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**(24): 11911-11919
- Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee GG (2005) In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**(13): 8669-8674
- Deng T, Sharps JL, Brownlee GG (2006b) Role of the influenza virus heterotrimeric RNA polymerase complex in the initiation of replication. *J Gen Virol* **87**(Pt 11): 3373-3377
- Deng T, Vreede FT, Brownlee GG (2006c) Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* **80**(5): 2337-2348
- Desselberger U, Racaniello VR, Zazra JJ, Palese P (1980) The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**: 315-328
- Detjen BM, St Angelo C, Katze MG, Krug RM (1987) The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**(1): 16-22
- Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240): 914-918
- Digard P, Blok VC, Inglis SC (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**(1): 162-169
- Digard P, Elton D, Bishop K, Medcalf E, Weeds A, Pope B (1999) Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol* **73**(3): 2222-2231
- Duhaut SD, McCauley JW (1996) Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**(2): 326-337
- Dye BT, Miller DJ, Ahlquist P (2005) In vivo self-interaction of nodavirus RNA replicase protein a revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Virol* **79**(14): 8909-8919
- Elton D, Medcalf E, Bishop K, Digard P (1999) Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. *Virology* **260**(1): 190-200
- Elton D, Simpson HM, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**(1): 408-419
- Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS



(2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* **5**(4): 635-651

Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, Kobayashi R, Blencowe BJ, Ingles CJ (2002) Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna* **8**(9): 1102-1111

Enami K, Sato TA, Nakada S, Enami M (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* **68**: 1432-1437

Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* **19**(8): 5363-5372

Engelhardt OG, Smith M, Fodor E (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **79**(9): 5812-5818

Falcón AM, Fortes P, Marión RM, Beloso A, Ortín J (1999) Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* **27**: 2241-2247

Falcon AM, Marion RM, Zurcher T, Gomez P, Portela A, Nieto A, Ortin J (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* **78**(8): 3880-3888

Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E, Brownlee GG (2003) Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* **278**(22): 20381-20388

Finkelstein DB, Mukatira S, Mehta PK, Obenauer JC, Su X, Webster RG, Naeve CW (2007) Persistent host markers in pandemic and

H5N1 influenza viruses. *J Virol* **81**(19): 10292-10299

Flick R, Hobom G (1999) Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *J Gen Virol* **80** ( Pt **10**): 2565-2572

Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Neumeier E, Hobom G (1996) Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna* **2**(10): 1046-1057

Fodor E, Crow M, Mingay LJ, Deng T, Sharps J, Fechter P, Brownlee GG (2002) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* **76**: 8989-9001

Fodor E, Mingay LJ, Crow M, Deng T, Brownlee GG (2003) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**(8): 5017-5020

Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG (1994) The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**(6): 4092-4096

Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG (1995) Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol* **69**: 4012-4019

Fodor E, Seong BL, Brownlee GG (1993) Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74**: 1327-1333

Fodor E, Smith M (2004) The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* **78**(17): 9144-9153

- Fong YW, Zhou Q (2001) Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* **414**(6866): 929-933
- Fortes P, Beloso A, Ortín J (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J* **13**: 704-712
- Fortes P, Lamond AI, Ortín J (1995) Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J Gen Virol* **76**: 1001-1007
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD (2004) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1356-1361
- Fuerst TR, Earl PL, Moss B (1987) Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol Cell Biol* **7**: 2538-2544
- Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2005) Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**(6): 3766-3774
- Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2002-2007
- Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, Mihara M, Naitou M, Endoh H, Nakamura T, Akimoto C, Yamamoto Y, Katagiri T, Foulds C, Takezawa S, Kitagawa H, Takeyama K, O'Malley BW, Kato S (2007) DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* **9**(5): 604-611
- Fuller-Pace FV, Ali S (2008) The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 4): 609-612
- Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18590-18595
- Gabriel G, Herwig A, Klenk HD (2008) Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin alpha1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* **4**(2): e11
- Garaigorta U, Falcon AM, Ortín J (2005) Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**(24): 15246-15257
- Garaigorta U, Ortín J (2007) Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4573-4582
- Garcia-Robles I, Akarsu H, Muller CW, Ruigrok RW, Baudin F (2005) Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**(1): 329-336
- Garfinkel MS, Katze MG (1992) Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**: 9383-9390
- Garfinkel MS, Katze MG (1993) Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **268**(30): 22223-22226

- Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* **76**: 5098-5108
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1417-1423
- Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* **77**(13): 7214-7224
- Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W (2004) Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* **78**(10): 5288-5298
- Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez-Pastrana E, Portela A (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80**: 1635-1645
- González S, Ortín J (1999a) Characterization of the influenza virus PB1 protein binding to vRNA: Two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* **73**: 631-637
- González S, Ortín J (1999b) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* **18**: 3767-3775
- Goregaoker SP, Culver JN (2003) Oligomerization and activity of the helicase domain of the tobacco mosaic virus 126- and 183-kilodalton replicase proteins. *J Virol* **77**(6): 3549-3556
- Goutagny N, Severa M, Fitzgerald KA (2006) Pin-ning down immune responses to RNA viruses. *Nat Immunol* **7**(6): 555-557
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74
- Grande-Perez A, Lazaro E, Lowenstein P, Domingo E, Manrubia SC (2005) Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4448-4452
- Greco-Stewart VS, Miron P, Abraham A, Pelchat M (2007) The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology* **357**(1): 68-78
- Greco-Stewart VS, Thibault CS, Pelchat M (2006) Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA. *Virology* **356**(1-2): 35-44
- Guil S, Gattoni R, Carrascal M, Abian J, Stevenin J, Bach-Elias M (2003) Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **23**(8): 2927-2941
- Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortín J, Hart DJ, Cusack S (2008) The structural basis for cap-binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 500-506
- Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S (2006) NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol*

- Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S (2007) NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(3): 263-269
- Hagen M, Chung TD, Butcher JA, Krystal M (1994) Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol* **68**(3): 1509-1515
- Hagen M, Tiley L, Chung TD, Krystal M (1995) The role of template-primer interactions in cleavage and initiation by the influenza virus polymerase. *J Gen Virol* **76** ( Pt 3): 603-611
- Hansen JL, Long AM, Schultz SC (1997) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**: 1109-1122
- Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y (2008) Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* **454**(7206): 890-893
- Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG (2006) Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* **80**(16): 7789-7798
- Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hamada N, Mizoue K, Tsumura N, Kato H, Toyoda T (2001) Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes to Cells* **6**: 87-97
- Harris A, Forouhar F, Qiu S, Sha B, Luo M (2001) The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* **289**(1): 34-44
- Harris D, Zhang Z, Chaubey B, Pandey VN (2006) Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* **5**(6): 1006-1018
- Harvey R, Martin AC, Zambon M, Barclay WS (2004) Restrictions to the adaptation of influenza A virus H5 hemagglutinin to the human host. *J Virol* **78**(1): 502-507
- Hase ME, Yalamanchili P, Visa N (2006) The Drosophila heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. *J Biol Chem* **281**(51): 39135-39141
- Hatada E, Fukuda R (1992) Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* **73**: 3325-3329
- Hatada E, Saito S, Fukuda R (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol* **73**(2425): 2425-2433
- Hatada E, Saito S, Okishio N, Fukuda R (1997) Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* **78**: 1059-1063
- Hatada E, Takizawa T, Fukuda R (1992) Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol* **73**: 17-25
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**(5536): 1840-1842
- Hay AJ, Skehel JJ, McCauley J (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* **116**: 517-522

- Heggeness MH, Smith PR, Ulmanen I, Krug RM, Chopin PW (1982) Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology* **118**: 466-470
- Heise T, Sommer G, Reumann K, Meyer I, Will H, Schaal H (2006) The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element. *Nucleic Acids Res* **34**(1): 353-363
- Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**(4): 577-578
- Heller E, Scholtissek C (1980) Evidence for intracistronic complementation of the product of the influenza virus gene Ptra (P3 of fowl plague virus). *J Gen Virol* **49**(1): 133-139
- Hemerka JN, Wang D, Weng Y, Lu W, Kaushik RS, Jin J, Harmon AF, Li F (2009) Detection and Characterization of Influenza A Virus Pa-Pb2 Interaction through a Bimolecular Fluorescence Complementation Assay. *J Virol* **83**(8): 3944-3955
- Hirling H, Scheffner M, Restle T, Stahl H (1989) RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* **339**(6225): 562-564
- Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *Embo J* **20**(5): 1153-1163
- Hogbom M, Jager K, Robel I, Unge T, Rohayem J (2009) The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J Gen Virol* **90**(Pt 2): 281-291
- Holsinger LJ, Lamb RA (1991) Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotrimer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**(1): 32-43
- Honda A, Mizumoto K, Ishihama A (1999) Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **4**(8): 475-485
- Honda A, Mizumoto K, Ishihama A (2002) Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13166-13171
- Honda A, Mukaigawa J, Yokoiyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, Krystal M, Nayak DP, Ishihama A (1990) Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem Tokyo* **107**(4): 624-628
- Honda A, Okamoto T, Ishihama A (2007) Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* **12**(2): 133-142
- Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1987) Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J Biochem Tokyo* **102**(5): 1241-1249
- Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* **104**(6): 1021-1026
- Hope DA, Diamond SE, Kirkegaard K (1997) Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J Virol* **71**(12): 9490-9498
- Horimoto T, Kawaoka Y (1994) Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* **68**(5): 3120-3128
- Horne RW, Waterson AP, Wildy P, Famham AE (1960) The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies on the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology* **11**: 79-88

- Hovhannisyan RH, Carstens RP (2007) Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J Biol Chem* **282**(50): 36265-36274
- Hoyle L, Horne RW, Waterson AP (1961) The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**: 448-459
- Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 8140-8144
- Huang TS, Palese P, Krystal M (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**(11): 5669-5673
- Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortín J, Nieto A (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**: 8597-8604
- Hughey PG, Roberts PC, Holsinger LJ, Zebedee SL, Lamb RA, Compans RW (1995) Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology* **212**(2): 411-421
- Inglis SC, Barret T, Brown CM, Almond JW (1979) The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3790-3794
- Inglis SC, Brown CM (1981) Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res* **9**: 2727-2740
- Inglis SC, Carroll AR, Lamb RA, Mahy BWJ (1976) Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. **74**: 489-503
- Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y (2006) The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**(11): 5233-5240
- Jackson DA, Caton AJ, McCready SJ, Cook PR (1982) Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* **296**: 366-368
- Jalal C, Uhlmann-Schiffler H, Stahl H (2007) Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res*
- Janda M, Ahlquist P (1993) RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* **72**: 961-970
- Jensen ED, Niu L, Caretti G, Nicol SM, Teplyuk N, Stein GS, Sartorelli V, van Wijnen AJ, Fuller-Pace FV, Westendorf JJ (2008) p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **103**(5): 1438-1451
- Jorba N, Area E, Ortín J (2008a) Oligomerisation of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol* **89**: 520-524
- Jorba N, Juárez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamarreño N, Albar JP, Ortín J (2008b) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**: 2077-2088
- Josset L, Frobert E, Rosa-Calatrava M (2008) Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J Clin Virol* **43**(4): 381-390



- Kafasla P, Patrinoú-Georgoula M, Lewis JD, Guialis A (2002) Association of the 72/74-kDa proteins, members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M group, with the pre-mRNA at early stages of spliceosome assembly. *Biochem J* **363**(Pt 3): 793-799
- Kaiser WJ, Chaudhry Y, Sosnovtsev SV, Goodfellow IG (2006) Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol* **87**(Pt 2): 363-368
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**(4): 513-525
- Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Manley JL (2007) The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev* **21**(14): 1779-1789
- Kash JC, Cunningham DM, Smit MW, Park Y, Fritz D, Wilusz J, Katze MG (2002) Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J Virol* **76**(20): 10417-10426
- Kato A, Mizumoto K, Ishihama A (1985) Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus. *Virus Res* **3**(2): 115-127
- Katze MG, Detjen BM, Safer B, Krug RM (1986) Translational control by influenza virus: suppression of the kinase that phosphorylates the alpha subunit of initiation factor eIF-2 and selective translation of influenza viral mRNAs. *Mol Cell Biol* **6**(5): 1741-1750
- Katze MG, Krug RM (1984) Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol Cell Biol* **4**(10): 2198-2206
- Katze MG, Krug RM (1990) Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* **44**(265): 265-277
- Kawaguchi A, Nagata K (2007) De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J* **26**(21): 4566-4575
- Kerry PS, Willsher N, Fodor E (2008) A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology* **373**(1): 202-210
- Kim HJ, Fodor E, Brownlee GG, Seong BL (1997) Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo. *J Gen Virol* **78** ( Pt 2): 353-357
- Kimura Y, Sakai F, Nakano O, Kisaki O, Sugimoto H, Sawamura T, Sadano H, Osumi T (2002) The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J Biol Chem* **277**(23): 20611-20617
- Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**(6): 1248-1257
- Kobayashi M, Toyoda T, Ishihama A (1996) Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol* **141**: 525-539
- Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L (2007) Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **81**(13): 7011-7021
- Kohler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 761-773

- Kolpashchikov DM, Honda A, Ishihama A (2004) Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry* **43**(19): 5882-5887
- Kramer A, Liashkovich I, Oberleithner H, Ludwig S, Mazur I, Shahin V (2008) Apoptosis leads to a degradation of vital components of active nuclear transport and a dissociation of the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(32): 11236-11241
- Krug RA, Ueda M, Palese P (1975) Temperature-sensitive mutants of influenza WSN virus defective in virus-specific RNA synthesis. *J Virol* **16**: 790-796
- Krug RM, Broni BA, Bouloy M (1979) Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**: 329-334
- Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S, Naffakh N (2007) Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* **362**(2): 271-282
- Lai MC, Lee YH, Tarn WY (2008) The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell* **19**(9): 3847-3858
- Lai MM (1998) Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* **244**: 1-12
- Lamb RA, Choppin PW (1979) Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4908-4912
- Lamb RA, Choppin PW (1981) Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology* **112**(2): 729-737
- Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ (1980) Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(1857): 1857-1861
- Lamb RA, Lai C-J (1982) Spliced and unspliced messenger RNAs synthesized from cloned influenza virus M DNA in an SV40 vector: Expression of the influenza virus membrane protein (M1). *Virology* **123**: 237-256
- Lamb RA, Lai CJ (1980) Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**: 475-485
- Lamb RA, Lai CJ (1984) Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology* **135**(1): 139-147
- Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW (1981) Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4170-4174
- Leahy MB, Dobbyn HC, Brownlee GG (2001) Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J Virol* **75**(15): 7042-7049
- Lee MK, Bae SH, Park CJ, Cheong HK, Cheong C, Choi BS (2003a) A single-nucleotide natural variation (U4 to C4) in an influenza A virus promoter exhibits a large structural change: implications for differential viral RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **31**(4): 1216-1223



- Lee MT, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L (2002) Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **30**(2): 429-438
- Lee MT, Klumpp K, Digard P, Tiley L (2003b) Activation of influenza virus RNA polymerase by the 5' and 3' terminal duplex of genomic RNA. *Nucleic Acids Res* **31**(6): 1624-1632
- Lee TG, Tang N, Thompson S, Miller J, Katze MG (1994) The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol Cell Biol* **14**(4): 2331-2342
- Li ML, Ramirez BC, Krug RM (1998) RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *Embo J* **17**(19): 5844-5852
- Li ML, Rao P, Krug RM (2001) The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO Journal* **20**: 2078-2086
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, Garcia-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW (2004) Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1350-1355
- Li X, Palese P (1994) Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *Journal of Virology* **68**(2): 1245-1249
- Li Y, Wang X, Zhang X, Goodrich DW (2005a) Human hHpr1/p84/Thoc1 regulates transcriptional elongation and physically links RNA polymerase II and RNA processing factors. *Mol Cell Biol* **25**(10): 4023-4033
- Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K (2005b) Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* **79**(18): 12058-12064
- Liang Y, Hong Y, Parslow TG (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**(16): 10348-10355
- Liang Y, Huang T, Ly H, Parslow TG (2008) Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**(1): 229-236
- Liu ZR (2002) p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol Cell Biol* **22**(15): 5443-5450
- López-Turiso JA, Martínez C, Tanaka T, Ortín J (1990) The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* **16**(3): 325-337
- Ludwig S, Planz O (2008) Influenza viruses and the NF-kappaB signaling pathway - towards a novel concept of antiviral therapy. *Biol Chem* **389**(10): 1307-1312
- Luo GX, Luytjes W, Enami M, Palese P (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**(6): 2861-2867
- Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**(5576): 2218-2222
- Madin SH, Darby NB, Jr. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* **98**(3): 574-576

- Mahy BWJ (1983) Mutants of influenza virus. In *Genetics of influenza viruses*, Palese P, Kingsbury DW (eds), pp 192-253. Wien: Springer Verlag
- Maier HJ, Kashiwagi T, Hara K, Brownlee GG (2008) Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology* **370**(1): 194-204
- Marión RM, Zürcher T, de la Luna S, Ortín J (1997) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* **78**: 2447-2451
- Martin K, Helenius A (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**(1): 117-130
- Martín-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2001) Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports* **2**: 313-317
- Massicot JG, Van Wyke K, Chanock RM, Murphy BR (1982) Evidence for intrasegmental complementation between two influenza A viruses having ts mutations on their P1 genes. *Virology* **117**(2): 496-500
- Mathur M, Tucker PW, Samuels HH (2001) PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2298-2311
- Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K (1981) Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1): 601-613
- Mayer D, Molawi K, Martinez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, Baginsky S, Grossmann J, Garcia-Sastre A, Schwemmle M (2007) Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. *J Proteome Res* **6**(2): 672-682
- Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**(5): 1140-1152
- Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T, Wolff T, Planz O, Ludwig S (2007) Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol* **9**(7): 1683-1694
- McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA (2007) Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell host & microbe* **2**(4): 240-249
- McCown MF, Pekosz A (2006) Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**(16): 8178-8189
- Medcalf L, Poole E, Elton D, Digard P (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol* **73**(9): 7349-7356
- Mena I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* **75**: 2109-2114
- Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortín J, Arrese M, Vallejo D, Portela A (1999) Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* **73**: 1186-1194

- Merz C, Urlaub H, Will CL, Luhrmann R (2007) Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *Rna* **13**(1): 116-128
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**(6): 751-763
- Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* **81**(2): 514-524
- Miller LC, Blandford V, McAdam R, Sanchez-Carbente MR, Badeaux F, DesGroseillers L, Sossin WS (2009) Combinations of DEAD box proteins distinguish distinct types of RNA: protein complexes in neurons. *Mol Cell Neurosci* **40**(4): 485-495
- Min JY, Krug RM (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7100-7105
- Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K (2001) Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**(4): 1899-1908
- Momose F, Handa H, Nagata K (1996) Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* **78**(11-12): 1103-1108
- Momose F, Kikuchi Y, Komase K, Morikawa Y (2007) Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect* **9**(12-13): 1422-1433
- Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* **277**(47): 45306-45314
- Mukaigawa J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* **65**: 245-253
- Mullin AE, Dalton RM, Amorim MJ, Elton D, Digard P (2004) Increased amounts of the influenza virus nucleoprotein do not promote higher levels of viral genome replication. *J Gen Virol* **85**(Pt 12): 3689-3698
- Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**(5): 2318-2325
- Murayama R, Harada Y, Shibata T, Kuroda K, Hayakawa S, Shimizu K, Tanaka T (2007) Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun* **362**(4): 880-885
- Murti KG, Webster RG, Jones IM (1988) Localization of RNA polymerases of influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology* **164**: 562-566
- Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, Hopfner KP, Ha T (2009) Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* **323**(5917): 1070-1074
- Naffakh N, Massin P, Escriou N, Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S (2000) Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol* **81**(Pt 5): 1283-1291

- Naffakh N, Massin P, van der Werf S (2001) The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit. *Virology* **285**(2): 244-252
- Naffakh N, Tomoiu A, Rameix-Welti MA, van der Werf S (2008) Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* **62**: 403-424
- Nagata K, Kawaguchi A, Naito T (2008) Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev Med Virol* **18**(4): 247-260
- Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A, Nagata K (2007a) An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18235-18240
- Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K (2007b) Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**(3): 1339-1349
- Nakagawa Y, Kimura N, Toyoda T, Mizumoto K, Ishihama A, Oda K, Nakada S (1995) The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J Virol* **69**: 728-733
- Nakagawa Y, Oda K, Nakada S (1996) The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. *J Virol* **70**: 6390-6394
- Nayak DP, Hui EK, Barman S (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**(2): 147-165
- Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM (1998) Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* **1**: 991-1000
- Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P, Sleeman J, Lamond A, Mann M (1998) Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* **20**(1): 46-50
- Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* **71**(12): 9690-9700
- Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19**(24): 6751-6758
- Neumann G, Kawaoka Y (2006) Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* **12**(6): 881-886
- Newcomb LL, Kuo RL, Ye Q, Jiang Y, Tao YJ, Krug RM (2009) Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* **83**(1): 29-36
- Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS (2008) Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* **16**(4): 149-157
- Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**(7075): 490-492
- Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P (2007) Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**(Pt 8): 2280-2290

- Noton SL, Simpson-Holley M, Medcalf E, Wise HM, Hutchinson EC, McCauley JW, Digard P (2009) Studies of an influenza A virus temperature-sensitive mutant identify a late role for NP in the formation of infectious virions. *J Virol* **83**(2): 562-571
- Noueiry AO, Ahlquist P (2003) Brome mosaic virus RNA replication: revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 77-98
- O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroiaru J (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**(39): 22701-22704
- O'Neill RE, Palese P (1995) NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology* **206**(1): 116-125
- O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**(1): 288-296
- O'Reilly EK, Paul JD, Kao CC (1997) Analysis of the interaction of viral RNA replication proteins by using the yeast two-hybrid assay. *J Virol* **71**(10): 7526-7532
- Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, Nieto A, Ortín J, Skehel JJ, Portela A (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* **37**: 305-315
- Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, Eckhard J, Vinzing M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Wolff T (2007) IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol* **9**(4): 930-938
- Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**: 156-163
- Ozawa M, Maeda J, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2009) Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* **83**(7): 3384-3388
- Palese P, Compans RW (1976) Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* **33**(1): 159-163
- Palese P, Shaw M (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology 5th edition*, Knipe DM, Howley PM (eds), Vol. 1, pp 1647-1689. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**(2): 397-410
- Park YW, Katze MG (1995) Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* **270**(47): 28433-28439
- Park YW, Wilusz J, Katze MG (1999) Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6694-6699
- Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P (1986) Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* **59**(2): 377-383
- Pata JD, Schultz SC, Kirkegaard K (1995) Functional oligomerization of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* **1**(5): 466-477

- Patton JG, Porro EB, Galceran J, Tempst P, Nadal-Ginard B (1993) Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* **7**(3): 393-406
- Pauli EK, Schmolke M, Wolff T, Viemann D, Roth J, Bode JG, Ludwig S (2008) Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- $\kappa$ B-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathog* **4**(11): e1000196
- Peng R, Hawkins I, Link AJ, Patton JG (2006) The splicing factor PSF is part of a large complex that assembles in the absence of pre-mRNA and contains all five snRNPs. *RNA Biol* **3**(2): 69-76
- Perales B, de la Luna S, Palacios I, Ortín J (1996) Mutational analysis identifies functional domains in the Influenza A PB2 polymerase subunit. *J Virol* **70**: 1678-1686
- Perales B, Ortín J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* **71**: 1381-1385
- Perales B, Sanz-Ezquerro JJ, Gastaminza P, Ortega J, Fernández-Santarén J, Ortín J, Nieto A (2000) The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol* **74**: 1307-1312
- Perales C, Mateo R, Mateu MG, Domingo E (2007) Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* **369**(4): 985-1000
- Perez DR, Donis RO (1998) The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcription activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology* **249**(1): 52-61
- Perez-Gonzalez A, Rodriguez A, Huarte M, Salanueva IJ, Nieto A (2006) hCLE/CGI-99, a Human Protein that Interacts with the Influenza Virus Polymerase, Is a mRNA Transcription Modulator. *J Mol Biol* **362**(5): 887-900
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**(5801): 997-1001
- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528
- Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**: 847-858
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1990) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**: 3867-3874
- Pons MW (1971) Isolation of Influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA in viral RNP. *Virology* **46**: 149-160
- Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P (2004) Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**(1): 120-133
- Poon LL, Pritlove DC, Sharps J, Brownlee GG (1998) The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol* **72**: 8214-8219
- Poon LLM, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG (1999) Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**(3473-3476): 3473-3476



- Portela A, Zürcher T, Nieto A, Ortín J (1999) Replication of Orthomyxoviruses. *Adv Virus Res* **54**: 319-348
- Pritlove DC, Poon LLM, Devenish LJ, Mike B, Leahy MB, Brownlee GG (1999) A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J Virol* **73**: 2109-2114
- Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying PC, Sangsiriwut K, Pooruk P, Boonnak K, Khan-yok R, Thawachsupha P, Kijphati R, Sawanpanyalert P (2005) Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* **86**(Pt 2): 423-433
- Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(3): 2132-2137
- Qiu Y, Krug RM (1994) The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol* **68**: 2425-2432
- Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna* **1**(3): 304-316
- Rao P, Yuan W, Krug RM (2003) Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *Embo J* **22**(5): 1188-1198
- Regan JF, Liang Y, Parslow TG (2006) Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *J Virol* **80**(1): 252-261
- Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreno N, Fernandez Y, Juarez S, Ortín J (2008) The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* **3**(12): e3904
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**(10): 1030-1032
- Roberts PC, Lamb RA, Compans RW (1998) The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* **240**(1): 127-137
- Robertson JS (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acid Research* **6**(12): 3745-3757
- Robertson JS, Schubert M, Lazzarini RA (1981) Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* **38**: 157-163
- Rodriguez A, Perez-Gonzalez A, Nieto A (2007) Influenza virus infection causes the specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol* **81**: 5315-5324
- Rosonina E, Ip JY, Calarco JA, Bakowski MA, Emili A, McCracken S, Tucker P, Ingles CJ, Blencowe BJ (2005) Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo. *Mol Cell Biol* **25**(15): 6734-6746
- Rossow KL, Janknecht R (2003) Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* **22**(1): 151-156
- Ruigrok RW, Baudin F (1995) Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **76**: 1009-1014

- Salvatore M, Basler CF, Parisien JP, Horvarth CM, Bourmakina S, Zheng H, Muster T, Palese P, García-Sastre A (2002) Effects of Influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J of Virol* **76**: 1206-1212
- Sambrook J, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, Second Edition edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandri-Goldin RM (2004) Viral regulation of mRNA export. *J Virol* **78**(9): 4389-4396
- Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of co-expressed proteins. *J Virol* **69**: 2420-2426
- Sanz-Ezquerro JJ, Fernández Santarén J, Sierra T, Aragón T, Ortega J, Ortín J, Smith GL, Nieto A (1998) The PA influenza polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* **79**: 471-478
- Sanz-Ezquerro JJ, Zürcher T, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1996) The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol* **70**: 1905-1911
- Sato Y, Yoshioka K, Suzuki C, Awashima S, Hosaka Y, Yewdell J, Kuroda K (2003) Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology* **310**(1): 29-40
- Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzeig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM (2007) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1853-1858
- Schroder M, Baran M, Bowie AG (2008) Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J* **27**(15): 2147-2157
- Schroeder C, Heider H, Moncke-Buchner E, Lin TI (2005) The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**(1): 52-66
- Seo SH, Hoffmann E, Webster RG (2004) The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res* **103**(1-2): 107-113
- Sha B, Luo M (1997) Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* **4**(3): 239-244
- Shapiro GI, Krug RM (1988) Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* **62**(7): 2285-2290
- Shav-Tal Y, Zipori D (2002) PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* **531**(2): 109-114
- Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P (2008) Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog* **4**(6): e1000085
- Shih JW, Tsai TY, Chao CH, Wu Lee YH (2008) Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. *Oncogene* **27**(5): 700-714
- Shih SR, Krug RM (1996) Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* **226**: 430-435



- Shih SR, Nemeroff ME, Krug RM (1995) The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6324-6328
- Shimizu K, Handa H, Nakada S, Nagata K (1994) Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res* **22**(23): 5047-5053
- Sieczkarski SB, Whittaker GR (2002) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**(20): 10455-10464
- Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, McCauley J, Digard P (2002) A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza viruses. *Virology* **301**(2): 212-225
- Smallwood S, Cevik B, Moyer SA (2002) Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the sendai virus RNA polymerase. *Virology* **304**(2): 235-245
- Smith GL, Hay AJ (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**: 96-108
- Suárez P, Ortín J (1994) An estimation of the nucleotide substitution rate at defined positions in the influenza virus haemagglutinin gene. *J Gen Virol* **75**: 389-393
- Subbarao EK, London W, Murphy BR (1993) A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* **67**(4): 1761-1764
- Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**(5349): 393-396
- Takahashi K, Yoshida N, Murakami N, Kawata K, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Zinn AR, Shime H, Inoue N (2007) Dynamic regulation of p53 subnuclear localization and senescence by MORC3. *Mol Biol Cell* **18**(5): 1701-1709
- Takizawa N, Watanabe K, Nouno K, Kobayashi N, Nagata K (2006) Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect* **8**(3): 823-833
- Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, Garcia SA (2000) Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**(17): 7989-7996
- Tan SL, Katze MG (1998) Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**(9): 757-766
- Tapia-Paez I, Tammimies K, Massinen S, Roy AL, Kere J (2008) The complex of TFII-I, PARP1, and SFPQ proteins regulates the DYX1C1 gene implicated in neuronal migration and dyslexia. *FASEB J* **22**(8): 3001-3009
- Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 229-233
- Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ (2008) Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136
- Thierry F, Spring SB, Chanock RM (1980) Localization of the Ts defect in two Ts mutants of influenza A virus: evidence for the occurrence

of intracistronic complementation between Ts mutants of influenza A virus coding for the neuraminidase and nucleoprotein polypeptides. *Virology* **101**(2): 484-492

Tiley LS, Hagen M, Mathews JT, Krystal M (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J Virol* **68**: 5108-5116

Torreira E (2006) Estructura tridimensional de complejos heterotriméricos recombinantes de la polimerasa del virus de la gripe. Universidad Autónoma de Madrid,

Torreira E, Schoehn G, Fernández Y, Jorba N, Ruigrok RW, Cusack S, Ortín J, Llorca O (2007) Three-dimensional model for the isolated influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**: 3774-3783

Twu KY, Noah DL, Rao P, Kuo RL, Krug RM (2006) The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J Virol* **80**(8): 3957-3965

Ulmanen I, Broni BA, Krug RM (1981) Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7355-7359

Urban RJ, Bodenbun YH, Wood TG (2002) NH2 terminus of PTB-associated splicing factor binds to the porcine P450scc IGF-I response element. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(3): E423-427

Valcárcel J, Portela A, Ortín J (1991) Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* **72**: 1301-1308

van Duin J (1988) Single-stranded RNA bacteriophages. In *The bacteriophages*, Calendar R (ed), Vol. 1, pp 117-167. New York: Plenum Press

Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**(5912): 35-40

Venables JP, Koh CS, Froehlich U, Lapointe E, Couture S, Inkel L, Bramard A, Paquet ER, Watier V, Durand M, Lucier JF, Gervais-Bird J, Tremblay K, Prinos P, Klinck R, Elela SA, Chabot B (2008) Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Mol Cell Biol* **28**(19): 6033-6043

Vreede FT, Brownlee GG (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* **81**(5): 2196-2204

Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* **78**(17): 9568-9572

Wang P, Palese P, O'Neill RE (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**(3): 1850-1856

Wang QM, Hockman MA, Staschke K, Johnson RB, Case KA, Lu J, Parsons S, Zhang F, Rathnachalam R, Kirkegaard K, Colacino JM (2002) Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **76**(8): 3865-3872

Wang W, Cui ZQ, Han H, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Chen Z, Zhang XE (2008) Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* **36**(15): 4913-4928

Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, Krug RM (1999) RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *Rna* **5**(195): 195-205

- Watanabe K, Handa H, Mizumoto K, Nagata K (1996) Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol* **70**(1): 241-247
- Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arao Y, Suzawa M, Kobayashi Y, Yano T, Yoshikawa H, Masuhiro Y, Kato S (2001) A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *Embo J* **20**(6): 1341-1352
- Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y (2003) Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**(19): 10575-10583
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**(6172): 426-431
- WHO (1980) A revised system for influenza viruses. *Bull World Health Organ* **58**: 585-591
- Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, Chasin L (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3): 1373-1376
- Wilson BJ, Bates GJ, Nicol SM, Gregory DJ, Perkins ND, Fuller-Pace FV (2004) The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol Biol* **5**: 11
- Wolff T, O'Neill RE, Palese P (1998) NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* **72**: 7170-7180
- Wu X, Yoo Y, Okuhama NN, Tucker PW, Liu G, Guan JL (2006) Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat Cell Biol* **8**(7): 756-763
- Xiang W, Cuconati A, Hope D, Kirkegaard K, Wimmer E (1998) Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**(8): 6732-6741
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y (2006) Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**(7117): 378-382
- Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**(19): 11151-11155
- Yamanaka K, Nagata K, Ishihama A (1991) Temporal control for translation of influenza virus mRNAs. *Arch Virol* **120**(1-2): 33-42
- Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**(1): 249-255
- Ye Q, Krug RM, Tao YJ (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**(7122): 1078-1082
- Ye Z, Baylor NW, Wagner RR (1989) Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J Virol* **63**: 3586-3594

- Ye Z, Pal R, Fox JW, Wagner RR (1987) Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol* **61**: 239-246
- Yedavalli VS, Neuveut C, Chi YH, Kleiman L, Jeang KT (2004) Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**(3): 381-392
- Young RJ, Content J (1971) 5' -terminus of influenza virus RNA. *Nature New Biol* **230**: 140-142
- Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240): 909-913
- Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P (2005) Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**(1): e4
- Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P (2006) Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**(16): 7976-7983
- Zebedee SL, Lamb RA (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**(8): 2762-2772
- Zhang J, Pekosz A, Lamb RA (2000) Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* **74**(10): 4634-4644
- Zhirnov OP, Klenk HD (1997) Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* **235**(2): 302-310
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**(6903): 182-185
- Zolotukhin AS, Michalowski D, Bear J, Smulevitch SV, Traish AM, Peng R, Patton J, Shatsky IN, Felber BK (2003) PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6618-6630
- Zürcher T, de la Luna S, Sanz-Ezquerro JJ, Nieto A, Ortín J (1996) Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: Studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol* **77**: 1745-1749
- Zurcher T, Marion RM, Ortin J (2000) Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J Virol* **74**(18): 8781-8784
- Zvonarjev AY, Ghendon YZ (1980) Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity and its susceptibility to rimantadine. *J Virol* **33**: 583-586





# **ANEXO 1:**

## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**



## Anexo 1.1. Factores asociados a proteínas virales

Virus	Célula	Función biológica	Ref.
<b>Interacción con proteínas transcripcionales</b>			
NS1	CPSF	Se asocia a la señal poliA y es necesaria para el corte y poliadenilación de pre-mRNA	21
NS1	PABP2	Necesaria para la elongación de la cola poliA	20
PA	hCLE	Modulador de la transcripción celular	9, 10
RpRd	CTD de RNA pol II	Dominio implicado en el reclutamiento de factores necesarios para la transcripción	8
vRNP	TIF1-beta	Factor de regulación de la transcripción asociado a heterocromatina	6
RpRd/vRNP	hnRNPM	Se asocia a transcritos de la RNA pol II durante la iniciación	6, 36
RpRd	NXP2	Proteína de matrix nuclear implicada en la represión de la transcripción	36
vRNP	ILF3	Regulador de la transcripción génica	6
PB2	hnRNP U	Proteína de unión a pre-mRNA	daros no pub.
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de <i>splicing</i></b>			
NPs/RpRd	BAT1/UAP56	Factor de <i>splicing</i>	12, 13, 14
NS1	NS1-BP	Podría estar implicada en el <i>splicing</i> de pre-mRNAs	18
NS1	snRNP U6	Componente ribonucleico del <i>spliceosome</i>	19
vRNP	hnRNP A1	Factor del <i>spliceosome</i>	6
vRNP/RdRp	hnRNP M	Factor del <i>spliceosome</i>	6, 36
RpRd	hnRNP H1	Factor del <i>spliceosome</i>	36
vRNP	ILF3	Regulador de la transcripción génica	6
vRNP	SFR3	Factor de <i>splicing</i>	6
RpRd	DDX5	Factor implicado en el ensamblaje del <i>spliceosome</i>	36
RpRd	SFPQ/PSF	Factor implicado en el ensamblaje del <i>spliceosome</i> asociado al CTD de RNA pol II	36
RpRd	CoAA	Coactivador de la transcripción regulada por esteroides y del <i>splicing</i> alternativo	36
<b>Interacción con cromatina y otras proteínas nucleares</b>			
M1	Histonas	Proteínas constitutivas del nucleosoma	1, 2
NP	Histonas	Proteínas constitutivas del nucleosoma	1, 3, 4
PA	MCM	DNA helicasa implicada en replicación de plásmidos y en la progresión del ciclo celular	16
vRNP	RNA helicasa II	Helicasa dependiente de ATP	6
vRNP	DDB1	Proteína de unión a DNA asociada al complejo centromérico	6
vRNP	Hsc70	Proteína nuclear de respuesta al estrés celular	6, 30
vRNP	PARP1	chromatin-associated enzyme poly(ADP-ribose) polymerase	6
PA	CHD6	Remodelador de cromatina	41
NS1/NEP/M1	PML/ND10*	Implicados en respuesta celular antiviral	5
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de transporte celular</b>			
NP	CRM1	Factor de exportación nuclear	27
NP	KPNA1/2	Factor de importación nuclear	25, 43
NS1	TAP/p15	Factores de la vía de exportación de RNA	31
NS1	KPNA1/2/3/4/5/6	Factores de importación nuclear	40
NS2	Rab/hRIP1-yRIP1	Nucleoporinas	28



Virus	Célula	Función biológica	Ref.
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de transporte celular</b>			
PB1	RanBP5	Factor de importación nuclear	26
vRNP	KPNA1	Factor de importación nuclear	6
<b>PB2</b>	<b>KPNA1/2/6</b>	Factor de importación nuclear	39,42,43
vRNPs/NS1	PABP1	Proteína de transporte núcleo-citoplasma implicado en exportación de mRNAs	23,6
RpRd	DDX3	Proteína de transporte núcleo-citoplasma asociada a CRM1. helicasa DEAD-Box	36
NP	Actina	Componente de los filamentos de actina	29
<b>RpRd/vRNP</b>	<b>beta-tubulina</b>	Componente de los microtúbulos	6,36
virus/NS1	NXF1	Factor de exportación nuclear de mRNAs que contienen uniones exón-exón	37,38
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de traducción celular</b>			
RpRd	eIF4G	Componente del complejo de iniciación de la traducción del eIF4F	22
vRNP	L9/S5/L7/L5/P0	Componentes de las subunidades 40S y 60S del ribosoma	6
<b>RpRd</b>	<b>S3</b>	Componente de la subunidad 40S del ribosoma	36
<b>Interacción con proteínas nucleolares</b>			
NS1/vRNPs	Nucleolina	Proteína multifuncional del nucleolo	6,7
<b>vRNP</b>	<b>B23</b>	Chaperona multifuncional del nucleolo	6
<b>Interacción con proteínas mitocondriales</b>			
PB1-F2	ANT3	Proteína mitocondrial	35
<b>PB1-F2</b>	<b>VDAC1</b>	Proteína mitocondrial	35
virus	COXA1	Subunidad del citocromo c oxidasa (COX)	38
<b>Interacción con proteínas con otras funciones</b>			
NS1/RpRd	hStaufen	Proteína de unión a RNA implicada en la localización de mRNAs durante el desarrollo	32
<b>NPs</b>	<b>Tat-SF1</b>	Factor de transcripción presente en complejos de elongación	17
NP/PB2	Mx	Proteína antiviral de respuesta a interferón	33,34
<b>PB1</b>	<b>Ebp1</b>	Proteína nuclear multifuncional implicada en crecimiento celular	11
PB2	Hsp90	Proteína <i>house-keeping</i> multifuncional	6,12,15
<b>vRNA</b>	<b>GRSF1</b>	Regulador positivo de la traducción	24
vRNA	La	Autoantígeno LA	24
<b>virus</b>	<b>ATP6V0DI</b>	Factor de la vía de endocitosis implicada en la fusión de compartimentos intracelulares por acidificación	38
NS1	PKR	Respuesta antiviral (bloqueo traduccional y apoptosis)	45,46
<b>NS1</b>	<b>p85beta</b>	Subunidad reguladora de PI3K	44
NS1	CRK/CRKL Src	Señalización celular	48
<b>M1</b>	<b>VPS28</b>	Componente del complejo ESCRT-1	47
M1	Cdc42	Miembro de la familia Rho de unión a GTP	47
<b>PB2</b>	<b>MPO</b>	Hemoproteína	datos no pub.
<b>PB2</b>	<b>CSN1</b>	Fosfoproteína, miembro de la familia de Cns	datos no pub.



1. Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Muller, C.W., Ruigrok, R.W. & Baudin, F. Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* 332, 329-36 (2005).
2. Zhirnov, O.P. & Klenk, H.D. Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* 235, 302-10 (1997).
3. Takizawa, N., Watanabe, K., Nouno, K., Kobayashi, N. & Nagata, K. Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect* 8, 823-33 (2006).
4. Bukrinskaya, A.G., Vorkunova, G.K. & Vorkunova, N.K. Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* 45, 557-67 (1979).
5. Sato, Y. et al. Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology* 310, 29-40 (2003).
6. Mayer, D. et al. Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. *J Proteome Res* 6, 672-682 (2007).
7. Murayama, R. et al. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 880-5 (2007).
8. Engelhardt, O.G., Smith, M. & Fodor, E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* 79, 5812-8 (2005).
9. Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortin, J. & Nieto, A. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* 75, 8597-8604 (2001).
10. Perez-Gonzalez, A., Rodriguez, A., Huarte, M., Salanueva, I.J. & Nieto, A. hCLE/CGI-99, a Human Protein that Interacts with the Influenza Virus Polymerase, Is a mRNA Transcription Modulator. *J Mol Biol* 362, 887-900 (2006).
11. Honda, A., Okamoto, T. & Ishihama, A. Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* 12, 133-42 (2007).
12. Shimizu, K., Handa, H., Nakada, S. & Nagata, K. Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res* 22, 5047-5053 (1994).
13. Momose, F. et al. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75, 1899-908 (2001).
14. O'Neill, R.E. & Palese, P. NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology* 206, 116-25 (1995).
15. Momose, F. et al. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277, 45306-14 (2002).
16. Kawaguchi, A. & Nagata, K. De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J* 26, 4566-75 (2007).
17. Naito, T. et al. An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18235-40 (2007).
18. Wolff, T., O'Neill, R.E. & Palese, P. NS1-Binding protein (NS1-BP): a

- novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J. Virol.* 72, 7170-7180 (1998).
19. Qiu, Y., Nemeroff, M. & Krug, R.M. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna* 1, 304-316 (1995).
20. Chen, Z., Li, Y. & Krug, R.M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* 18, 2273-83 (1999).
21. Nemeroff, M.E., Barabino, S.M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R.M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* 1, 991-1000 (1998).
22. Aragón, T. et al. Translation factor eIF4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cel. Biol.* 20, 6259-6268 (2000).
23. Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* 84, 3263-3274 (2003).
24. Park, Y.W., Wilusz, J. & Katze, M.G. Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6694-9 (1999).
25. Wang, P., Palese, P. & O'Neill, R.E. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* 71, 1850-6 (1997).
26. Deng, T. et al. Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* 80, 11911-9 (2006).
27. Elton, D. et al. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75, 408-19 (2001).
28. O'Neill, R.E., Talon, J. & Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* 17, 288-96 (1998).
29. Digard, P. et al. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol* 73, 2222-31 (1999).
30. Watanabe, K. et al. Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle. *FEBS Lett* 580, 5785-90 (2006).
31. Wang, W. et al. Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* 36, 4913-28 (2008).
32. Falcón, A.M., Fortes, P., Marión, R.M., Beloso, A. & Ortín, J. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res.* 27, 2241-2247 (1999).
33. Turan, K. et al. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* 32, 643-52 (2004).
34. Zürcher, T., Pavlovic, J. & Staeheli, P. Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J Virol* 66, 5059-66 (1992).

35. Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 1, e4 (2005).
36. Jorba, N. et al. Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077-2088 (2008).
37. Satterly, N. et al. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1853-1858 (2007).
38. Hao, L. et al. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 454, 890-3 (2008).
39. Resa-Infante, P. et al. The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* 3, e3904 (2008).
40. Melen, K. et al. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol* 81, 5995-6006 (2007).
41. Alfonso-Dunn et al, datos no publicados.
42. Tarendeau, F. et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 14, 229-33 (2007).
43. Gabriel, G., Herwig, A. & Klenk, H.D. Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin alpha1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* 4, e11 (2008).
44. Li, Y., Anderson, D.H., Liu, Q. & Zhou, Y. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J Biol Chem* 283, 23397-409 (2008).
45. Hatada, E., Saito, S. & Fukuda, R. Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol* 73, 2425-2433 (1999).
46. Tan, S.L. & Katze, M.G. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* 18, 757-66 (1998).
47. Hui, E.K., Barman, S., Tang, D.H., France, B. & Nayak, D.P. YRKL sequence of influenza virus M1 functions as the L domain motif and interacts with VPS28 and Cdc42. *J Virol* 80, 2291-308 (2006).
48. Heikkinen, L.S. et al. Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J Biol Chem* 283, 5719-27 (2008).

## Anexo 1.2 Publicaciones de los periódicos La Vanguardia y El Día en Barcelona del año 1918 que informan sobre la gripe española.

La pandemia más letal y conocida fue denominada gripe española (virus A, subtipo H1N1) que duró desde 1918 a 1919. Se denominó así porque España era el país que publicaba más datos sobre el desastre sanitario que estaba ocasionando, mientras que en otros países los censuraban con motivo de la Primera Guerra Mundial en la que estaban inmersos. Se estima que entre 20 y 40 millones de personas murieron a causa del virus de la gripe, aunque la cifra de mortalidad es difícil de concretar debido a la coincidencia temporal con la guerra. Entre otras características, la mortalidad del virus era de entre el 2 y el 20% de todos los infectados (frente al 0,1% de la gripe común), y afectó sobretudo a adultos jóvenes (contrariamente a lo que ocurre con la gripe común).

En el artículo de El Día en Barcelona, el Dr. Grifols i Roig (mi bisabuelo) recomendaba el uso de mascarillas como medida preventiva ante la incertidumbre del agente causal de la gripe.

**La Vanguardia**  
1918

# La gripe provoca una alta mortalidad en Barcelona

*En un día se han registrado en nuestra ciudad 315 muertos*

OCTUBRE 23.— Siguen decreciendo, según datos oficiales, el número de infecciones, pero este descenso no continuó ayer en la cifra de la mortalidad, que sufrió un ligero aumento debido acaso al brusco cambio de tiempo.

De las doce del día 21 a igual hora de ayer se recibieron en la Inspección de Sanidad los partes de 250 defunciones. Los registrados el día 21 en la oficina de Estadística Demográfica y Padrón Sanitario ascienden a 315. Durante el mismo día se efectuaron en los cementerios de esta ciudad 273 enterramientos.

Para mientras duren las actuales circunstancias sanitarias, el gobernador ha prohibido reuniones, mítines y todos los actos públicos que supongan aglomeración de personas.

La inspección provincial de Sanidad ha publicado una circular donde pide a los inspectores que con el fin de "formar un juicio lo más exacto posible de la actual epidemia de la gripe, y hacer una estadística completa de la misma", notifiquen diariamente el número de atacados, destacando los casos más complicados. ●



La lucha contra la gripe se ha convertido en una carrera contrarreloj



## LA BACTERIOLOGIA Y EL DR. GRIFOLS Y ROIG

El joven y culto doctor Grifols y Roig (1) mostrando a nuestro redactor Sancho Gallel (3) el funcionamiento del aparato del análisis de la sangre de su invención, mientras el doctor Gordan (2) y los practicantes se entregaban a interesantes investigaciones en el laboratorio del primero.

(Foto Marín.)

Con motivo de la devastadora reciente epidemia gripal, han illovido una enormead de opiniones sobre la misma, y nosotros, una vez normalizada la situación sanitaria en Barcelona, hemos creído oportuno recabar la opinión del joven y culto doctor Grifols y Roig, sabio director del consagrado Instituto General de Análisis Clínicos, Bacteriológicos y Químicos, emplazado espléndidamente en el piso principal del núm. 6 de la plaza de Urquinaona.

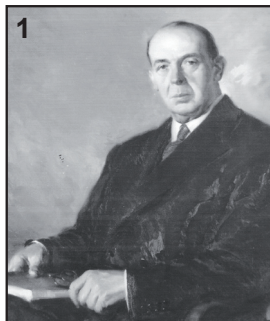
Nuestro antiguo y buen amigo don Rafael Espinos, profundo conocedor de las esferas médicas catalanas, tuvo la bondad de presentarnos al ilustre bacteriólogo doctor Grifols y Roig, ex interno del Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de Barcelona, ex asistente a la clínica segunda y laboratorio de la Universidad de Munich, ex jefe de Histopatología del Hospital de la Santa Cruz y profesor de Riematología de la Academia y Laboratorio de Ciencias Médicas de Cataluña, a quien secundan, muy eficazmente por cierto, la eminencia farmacéutica alemana doctor Gordan (director del Laboratorio de Bacteriología de Danzig) y el doctor Felis, eminente profesor numerario, por oposición, de la Facultad de Medicina de Barcelona y de Histopatología en la Academia y Laboratorio de Cataluña.

es evitarlo, para lo cual, y como el propio doctor Grifols y Roig propuso en un comunicado dirigido al gobernador, Sr. González Rothwos, debe proveerse la gente de una mascarilla formada por dos capas de gasa y una de algodón, con lo cual se evita el contagio.

Dijonos además que es necesario que los Congresos médicos acuerden la intensificación de los análisis antes de diagnosticar cualquier dolencia, para saber a punto fijo la enfermedad que se ha de combatir, teniendo en cuenta la idiosincrasia de cada enfermo y teniendo muy presente la unificación de los procedimientos analíticos, para lo cual no es necesario que en cada población haya laboratorios, pues hoy en día por correo se pueden remitir admirablemente esputos, sangre, etc., máxime cuando el propio doctor Grifols y Roig ha inventado un práctico aparato para el análisis de la sangre, última palabra de la ciencia moderna.

Como dato curioso hemos de consignar que el doctor Gordan, tras improbos trabajos, y por encargo del Gobierno alemán, ha resuelto el problema de los extractos concentrados de naranja, que tanta trascendencia encierran para todas las industrias que tienen por base este dorado fruto.

Nuestro fotógrafo Sr. Marín, hábil-



1





## **ANEXO 2:**

### **PUBLICACIONES**



Short  
CommunicationCorrespondence  
Juan Ortín  
jortin@cnb.uam.esReceived 16 August 2007  
Accepted 10 October 2007Oligomerization of the influenza virus polymerase complex *in vivo*

Núria Jorba, Estela Areat and Juan Ortín

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Darwin 3, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

The influenza virus polymerase is a heterotrimer formed by the PB1, PB2 and PA subunits and is responsible for virus transcription and replication. We have expressed the virus polymerase complex by co-transfection of the subunit cDNAs, one of which was tandem affinity purification (TAP)-tagged, into human cells. The intracellular polymerase complexes were purified by the TAP approach, involving two affinity chromatography steps, IgG–Sepharose and calmodulin–agarose. Gel-filtration analysis indicated that, although most of the purified polymerase behaved as a heterotrimer, a significant proportion of the purified material migrated as polymerase dimers, trimers and higher oligomers. Co-purification of polymerase complexes alternatively tagged in the same subunit confirmed that the polymerase complex might form oligomers intracellularly. The implications of this observation for virus infection are discussed.

The influenza A viruses belong to the family *Orthomyxoviridae* and contain a segmented genome formed by eight single-stranded RNA molecules of negative polarity (reviewed by Elton *et al.*, 2005; Neumann *et al.*, 2004; Palese & Shaw, 2006). The molecular machines responsible for transcription and replication of the virus genome are the ribonucleoprotein (RNP) complexes, each one containing one RNA segment associated to nucleoprotein (NP) monomers and the polymerase complex (Klumpp *et al.*, 1997; Martín-Benito *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2000). The enzyme responsible for virus RNA synthesis is the RNA polymerase, a heterotrimer composed of the PB1, PB2 and PA subunits. PB1 is the structural core of the complex (Digard *et al.*, 1989) and contains the polymerase and endonuclease activities. PB2 is responsible for cap recognition during transcription initiation and PA is a phosphoprotein with protease activity involved in RNA replication (reviewed by Elton *et al.*, 2005; Palese & Shaw, 2006). The virus polymerase complex is a very compact structure (Area *et al.*, 2004; Torreira *et al.*, 2007) and mutations in the various subunits may alter either transcription or replication (Fodor *et al.*, 2002; Gastaminza *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2006).

The first step in virus gene expression is the primary transcription of virion RNPs. The RNP-associated viral polymerase recognizes cellular pre-mRNAs and cleaves them at 10–15 nt downstream of the cap, thereby generating cap-containing primers for virus mRNA

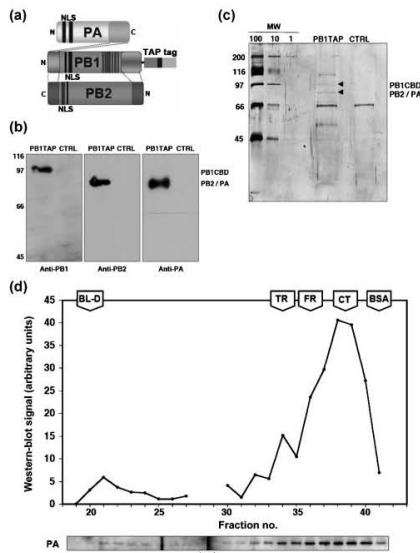
synthesis (Bouloy *et al.*, 1978; Krug *et al.*, 1979). Virus transcription is terminated by reiterate copy of an oligo-U signal located close to the 5' terminus of the template, which results in the synthesis of a 3'-terminal poly(A) tail (Poon *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1981). On the contrary, replication of viral RNPs does not require capped primers and occurs by the synthesis of a complementary RNA (cRNA) intermediate, which is a complete copy of the virion RNA (vRNA) (Hay *et al.*, 1982), and serves as template for the generation of progeny vRNAs. Both vRNAs and cRNAs are encapsidated into RNP structures during replication (reviewed by Elton *et al.*, 2005).

In addition to the RNP-associated polymerase, soluble polymerase complexes have been detected in infected cells (Detjen *et al.*, 1987) and the interaction of cellular proteins with the polymerase complex has been described (Deng *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2007; Momose *et al.*, 2002; Naito *et al.*, 2007) (N. Jorba and others, unpublished data). To characterize these soluble intracellular polymerase complexes we have addressed their expression and purification from human cells. Here we show that dimers, trimers and higher order oligomers of the polymerase heterotrimer can be detected in highly purified preparations of virus RNA polymerase and discuss the possible implications of this observation.

To express the recombinant virus polymerase, cultures of HEK 293T cells were infected with vTF7-3 virus and subsequently transfected with plasmids pGPB1TAP (or pGPB1 as a control), pGPB2 and pGPA (Fig. 1a), using a calcium phosphate transfection protocol. Total cell soluble extracts were applied to IgG–Sepharose beads (Amersham Pharmacia), the resin was washed extensively and the polymerase was eluted by digestion with tobacco etch virus

<sup>†</sup>Present address: Department of Neurology, Columbia University, New York, NY 10033, USA.

A figure showing the control of the potential proteolysis of the influenza polymerase is available with the online version of this paper.

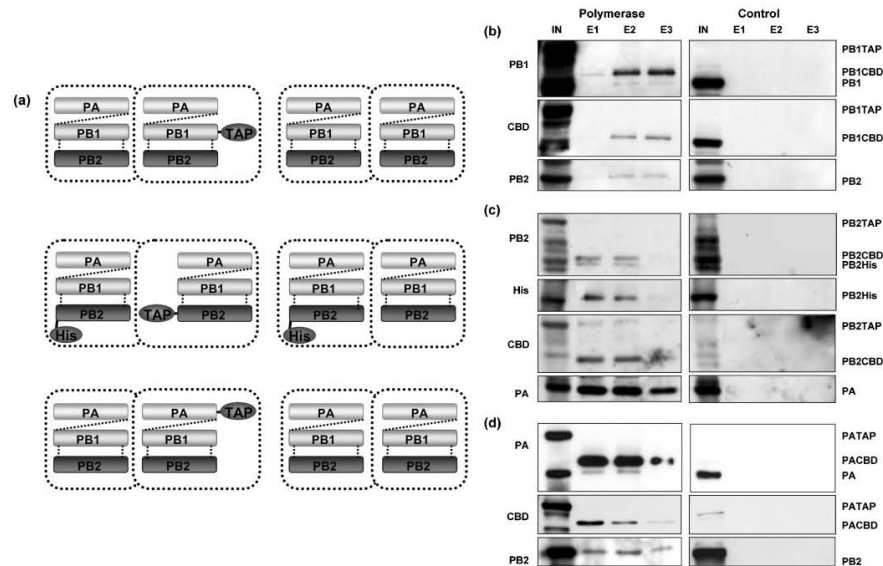


**Fig. 1.** Gel-filtration analysis of purified influenza polymerase-containing complexes. Wild-type polymerase polPB1TAP was expressed and purified by the TAP approach as described previously (Villacé *et al.*, 2004). (a) Diagram of the polymerase complex with a TAP tag attached at the C terminus of PB1 subunit. The TAP tag (Rigaut *et al.*, 1999) allows the purification of protein complexes under very mild conditions by two steps of affinity chromatography, IgG-Sepharose and calmodulin-agarose. (b) Characterization of the purified material (PB1TAP) by Western-blot using anti-PB1, anti-PB2 and anti-PA antibodies. The analysis of a control (CTRL), purification of untagged polymerase complex, is also shown. (c) Protein composition of the purified material as determined by silver staining. The position of the polymerase subunits (PB1CBD, PB2/PA) is marked with arrowheads and indicated on the right. The mobility of molecular mass markers (MW) (100, 10 and 1 ng per protein band) is indicated on the left. (d) The purified polymerase complexes were filtered over a Sephacryl S400 column. The fractions obtained were analysed by Western-blot with anti-PA-specific antibodies. The results are indicated at the bottom of the figure and the quantification of the signal is presented in the upper part. The asterisks mark fractions whose quantification was not possible due to border effects in the protein gels. The mobility of molecular mass markers in the filtration is indicated at the top: BL-D, blue-dextran; TR, thyroglobulin; FR, ferritin; CT, catalase; BSA, BSA.

protease. The eluates were pooled and applied to calmodulin-agarose beads in the presence of calcium. After extensive washing, the proteins that bound

specifically were eluted with an EGTA-containing buffer. The material thus obtained contained all three subunits of the polymerase (Fig. 1b) and was highly purified. The polymerase subunits were clearly detectable in the sample (Fig. 1c, arrowheads), although host-cell-associated factors were also detected, as described elsewhere (N. Jorba and others, unpublished data). The size of the purified polymerase complexes was analysed by gel filtration over a calibrated Sephacryl S400 column and the results are presented in Fig. 1(d). Most of the polymerase, revealed by Western-blot using anti-PA antibodies, co-migrated with the catalase marker (MW 220 kDa), as expected for the heterotrimeric form of the enzyme. Similar results were obtained when the polymerase was revealed with antibodies specific for the PB2 subunit (data not shown). As these complexes were purified by affinity chromatography with tandem affinity purification (TAP)-tagged PB1, the results show that essentially heterotrimeric polymerase was formed and that PB1-PB2 and PB1-PA heterodimers, which could potentially be formed in the transfected cells, were not apparent in the purified samples (Fig. 1c and data not shown). On the contrary, the polymerase signal was skewed towards higher molecular mass forms and showed that some of the polymerase co-migrated with the ferritin and thyroglobulin markers (440 and 670 kDa, respectively). In addition, some purified polymerase appeared close to the column exclusion marker, in the MDa range. These results suggest that oligomeric forms of the polymerase complex are formed *in vivo*.

To explore the possibility of a polymerase heterotrimer-heterotrimer interaction *in vivo*, the polymerase was purified after expression of its subunits, one of which contained alternative tags in the same position. We used PB1TAP/PB1, PB2TAP/PB2His and PATAP/PA as alternatively tagged subunits in independent expression experiments. This approach would lead to the formation of two alternative heterotrimers in each experiment, namely PB1TAP-PB2-PA and PB1-PB2-PA or PB1-PB2TAP-PA and PB1-PB2His-PA or PB1-PB2-PATAP and PB1-PB2-PA, respectively (Fig. 2a, left). If both heterotrimers interact *in vivo*, purification by the TAP procedure should lead to the co-purification of the untagged PB1, the PB2His marker or the untagged PA, respectively. As controls, the wild type (wt) polymerase was expressed by itself or co-expressed with the PB2His subunit and purified in parallel by the TAP method (Fig. 2a, right). The results obtained for PB1TAP-PB2-PA/PB1-PB2-PA, for PB1-PB2TAP-PA/PB1-PB2His-PA and for PB1-PB2-PATAP/PB1-PB2-PA are presented in Fig. 2(b, c and d), respectively. Western-blot analyses are shown for the purified material with antibodies specific for (i) PB1, PB2 or PA, that would reveal all versions of these subunits; (ii) His tag, that would reveal PB2His and (iii) CBD tag, that would show the PB1, PB2 or PA protein resulting from the TAP-tagged subunit after TAP purification. In agreement with the results presented in Fig. 1, no signal was detected in control purifications with any of the antibodies used (Fig. 2b, c and



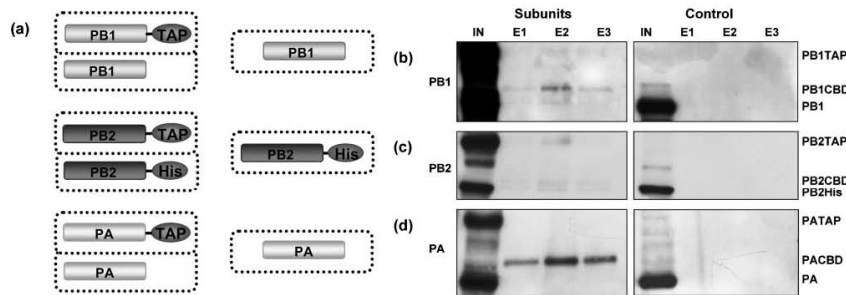
**Fig. 2.** Analysis of the oligomerization of influenza polymerase. Cultures of HEK 293T cells were co-transfected with the following expressing plasmids: PB1TAP + PB1 + PB2 + PA (or PB1 + PB2 + PA as control); PB1 + PB2TAP + PB2His + PA (or PB1 + PB2 + PB2His + PA as control) or, PB1 + PB2 + PATAP + PA (or PB1 + PB2 + PA as control). The potential complexes formed in the transfected cells are indicated in (a). The extracts from the transfected cells were used to purify intracellular polymerase complexes by the TAP approach. The analysis of the purified materials by Western-blot is presented in (b), (c) and (d). Antibodies specific for PB1 (PB1), PB2 (PB2) or PA (PA) subunits, for the His tag (His) and the CBD tag (CBD) were used. IN represents the extract used as input for purification. E1–E3 represent the successive elution steps of the final calmodulin-agarose column. The position of the relevant protein bands recognized by the various antibodies is indicated to the right of the figure.

d, right). On the contrary, a clear band of reactivity with anti-His antibody was observed in the TAP-purified material after co-expression of PB2TAP- and PB2His-containing polymerase (Fig. 2c, left, His). This was consistent with the appearance of a doublet in the signal with anti-PB2 antibody (Fig. 2c, left, PB2), one of which co-migrated with the signal detected with the anti-CBD antibody (Fig. 2c, left, CBD) and the other with the anti-His antibody. Finally, the appearance of PA-specific signal (Fig. 2c, left, PA) verified that a heterotrimer had been purified during the TAP procedure. Similar results were obtained for the co-expression of polymerase with tagged and untagged PB1 or PA subunits (Fig. 2b and d). Thus, the reactivity with anti-PB1 or anti-PA antibody of the TAP-purified material after co-expression of PB1TAP or PATAP and wt polymerase showed a doublet signal (Fig. 2b, left, PB1; Fig. 2d, left, PA), the stronger of which co-migrated with the signal observed with the anti-CBD

antibody (Fig. 2b, left, CBD; Fig. 2d, left, CBD). Verification of heterotrimer formation was carried out by Western-blot using antibodies specific for PB2 (Fig. 2b, left, PB2; Fig. 2d, left, PB2). To exclude the possibility that the double bands observed for PB1 or PA in Fig. 2(b) or Fig. 2(d), respectively, are the consequence of protein proteolysis, similar purifications were performed in the absence of untagged subunit expression. The results indicated that only the PB1CBD or PACBD were detected and no double band was observed (see Supplementary Fig. S1 available in JGV Online).

Taken together, the results presented in Figs 1 and 2 indicate that the influenza virus polymerase heterotrimer can form oligomers *in vivo*. Thus, the gel-filtration pattern presented in Fig. 1 shows polymerase aggregates with apparent molecular masses of 440, 670 kDa and higher. On the other hand, the TAP co-purification experiments





**Fig. 3.** Analysis of the interaction among individual polymerase subunits. Cultures of HEK 293T cells were co-transfected with plasmids expressing PB1TAP + PB1, PB2TAP + PB2His or PATAP + PA. The potential complexes formed are shown in (a). The extracts from the transfected cells were used for purification by the TAP procedure and the analysis of the purified materials by Western-blot is presented in (b), (c) and (d). Antibodies specific for PB1 (PB1), PB2 (PB2) or PA (PA) subunits were used. IN represents the extract used as input for purification. E1–E3 represent the successive elution steps of the final calmodulin-agarose column. The position of the relevant protein bands recognized by the various antibodies is indicated to the right of the figure.

indicate the association of polymerase complexes irrespective of the subunit that was differentially tagged. However, these results do not determine which subunit may participate in the associations among polymerase heterotrimers. To analyse this question only PB1TAP/PB1, PB2TAP/PB2His or PATAP/PA subunits were co-expressed instead of complete polymerase complexes (Fig. 3a). After purification by the TAP procedure, the purified material was probed with antibodies specific for the particular polymerase subunit expressed and the presence of the tagged subunit was verified by Western-blot with the CBD tag (data not shown). Co-purification was detected for untagged PB1 or PB2His with PB1TAP or PB2TAP, respectively (Fig. 3b, c, left). However, no interaction was observed between PATAP and PA subunits (Fig. 3d, left). These results are in agreement with previous data (Digard *et al.*, 1989) and suggest that the PB1 and/or PB2 subunits might be involved in the polymerase-polymerase association, although we cannot conclude a direct interaction between PB1 and/or PB2 since we cannot exclude the participation of a host factor(s) in the oligomerization *in vivo*.

At present we cannot verify the existence of the polymerase oligomeric forms in virus-infected cells but, if this were the case, these polymerase associations might be important for RNA transcription and/or replication in the infection cycle, as has been previously reported for positive-stranded RNA viruses, like poliovirus or hepatitis C virus (Lyle *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002) and negative-stranded RNA viruses, like Sendai virus (Cevik *et al.*, 2003; Smallwood *et al.*, 2002). In the influenza RNA replication process, the first nascent virus RNA contains the 5'-terminal conserved

sequence, which is an efficient and specific binding site for the polymerase (González & Ortín, 1999; Lee *et al.*, 2002; Tiley *et al.*, 1994). This recognition might be facilitated by an association of the incoming polymerase complex to the RNP-resident polymerase. As for many other viruses, oligomerization of the influenza virus replication complexes might provide important advantages for the efficiency of the interactions among virus and host factors required for RNA replication and transcription (reviewed by Ortín & Parra, 2006). However, an additional possibility could be considered for the requirement of polymerase-polymerase interactions *in vivo*. Thus, the process of encapsidation of the segmented genome into virus particles might require multiple contacts between the polymerase complexes present in the virion RNPs and, indeed, a mutation in the PA subunit has been described that is defective in particle formation (Regan *et al.*, 2006).

## Acknowledgements

The technical assistance of Y. Fernández and N. Zamarreño is gratefully acknowledged. N.J. was a fellow from Ministerio de Educación y Ciencia. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Ministerio de Educación y Ciencia) (grant BFU2004-491), Research Programme VIRHOST-CM from Comunidad de Madrid (grant S-SAL/0185/2006), European Vigilance Network for the Management of Antiviral Drug Resistance (VIRGIL) and the FLUPOL strep project (SP5B-CT-2007-044263).

## References

- Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2004). Three-dimensional structure

- of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 308–313.
- Boulou, M., Plotch, S. J. & Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4886–4890.
- Cevik, B., Smallwood, S. & Moyer, S. A. (2003). The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. *Virology* 313, 525–536.
- Deng, T., Engelhardt, O. G., Thomas, B., Akoulitchiev, A. V., Brownlee, G. G. & Fodor, E. (2006). The role of Ran binding protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* 80, 11911–11919.
- Detjen, B. M., St Angelo, C., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1987). The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* 61, 16–22.
- Digard, P., Blok, V. C. & Inglis, S. C. (1989). Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 171, 162–169.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L. & Ortín, J. (2005). Structure and function of the influenza virus RNP. In *Current Topics in Influenza Virology*, pp. 1–92. Edited by Y. Kawaoka. Norfolk: Horizon Scientific Press.
- Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P. & Brownlee, G. G. (2002). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* 76, 8989–9001.
- Gastaminza, P., Perales, B., Falcón, A. M. & Ortín, J. (2003). Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* 76, 5098–5108.
- González, S. & Ortín, J. (1999). Characterization of the influenza virus PB1 protein binding to vRNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* 73, 631–637.
- Hara, K., Schmidt, F. I., Crow, M. & Brownlee, G. G. (2006). Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* 80, 7789–7798.
- Hay, A. J., Skehel, J. J. & McCauley, J. (1982). Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* 116, 517–522.
- Klump, K., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J* 16, 1248–1257.
- Krug, R. M., Broni, B. A. & Boulou, M. (1979). Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized *in vivo* donated by host mRNAs? *Cell* 18, 329–334.
- Lee, M. T., Bishop, K., Medcalf, L., Elton, D., Digard, P. & Tiley, L. (2002). Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 30, 429–438.
- Lyle, J. M., Bullitt, E., Bienz, K. & Kirkegaard, K. (2002). Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* 296, 2218–2222.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2001). Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* 2, 313–317.
- Mayer, D., Molawi, K., Martínez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., Grossmann, J., García-Sastre, A. & Schwemmler, M. (2007). Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res* 6, 672–682.
- Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S., Morikawa, Y. & Nagata, K. (2002). Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277, 45306–45314.
- Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A. & Nagata, K. (2007). Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* 81, 1339–1349.
- Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Kawaoka, Y. (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 121–143.
- Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 74, 156–163.
- Ortín, J. & Parra, F. (2006). Structure and function of RNA replication. *Annu Rev Microbiol* 60, 305–326.
- Palese, P. & Shaw, M. (2006). *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 5th edn, pp. 1647–1689. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Poon, L. L. M., Pritlove, D. C., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* 73, 3473–3476.
- Regan, J. F., Liang, Y. & Parslow, T. G. (2006). Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *J Virol* 80, 252–261.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030–1032.
- Robertson, J. S., Schubert, M. & Lazzarini, R. A. (1981). Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* 38, 157–163.
- Smallwood, S., Cevik, B. & Moyer, S. A. (2002). Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the sendai virus RNA polymerase. *Virology* 304, 235–245.
- Tiley, L. S., Hagen, M., Mathews, J. T. & Krystal, M. (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J Virol* 68, 5108–5116.
- Torreira, E., Schoehn, G., Fernández, Y., Jorba, N., Ruigrok, R. W., Cusack, S., Ortín, J. & Llorca, O. (2007). Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 35, 3774–3783.
- Villacé, P., Marión, R. M. & Ortín, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32, 2411–2420.
- Wang, Q. M., Hockman, M. A., Staschke, K., Johnson, R. B., Case, K. A., Lu, J., Parsons, S., Zhang, F., Rathnachalam, R. & other authors (2002). Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 76, 3865–3872.





## RESEARCH ARTICLE

# Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors

Núria Jorba<sup>1,2</sup>, Silvia Juárez<sup>1</sup>, Eva Torreira<sup>1\*</sup>, Pablo Gastaminza<sup>1\*\*\*</sup>,  
Noelia Zamarreño<sup>1,2</sup>, Juan Pablo Albar<sup>1</sup> and Juan Ortín<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain

The influenza virus polymerase is formed by the PB1, PB2 and PA subunits and is required for virus transcription and replication in the nucleus of infected cells. Here we present the characterisation of the complexes formed intracellularly by the influenza polymerase in human cells. The virus polymerase was expressed by cotransfection of the polymerase subunits cDNAs, one of which fused to the tandem-affinity purification (TAP) tag. The intracellular complexes were purified by the TAP approach, which involves IgG-Sepharose and calmodulin-agarose chromatography, under very mild conditions. The purified complexes contained the heterotrimeric polymerase and a series of associated proteins that were not apparent in purifications of untagged polymerase used as a control. Several influenza polymerase-associated proteins were identified by MALDI-MS and their presence in purified polymerase-containing complexes were verified by Western blot. Their relevance for influenza infection was established by colocalisation with virus ribonucleoproteins in human infected cells. Most of the associated human factors were nuclear proteins involved in cellular RNA synthesis, modification and nucleo-cytoplasmic export, but some were cytosolic proteins involved in translation and transport. The interactions recognised in this proteomic approach suggest that the influenza polymerase might be involved in steps of the infection cycle other than RNA replication and transcription.

Received: May 28, 2007  
Revised: January 3, 2008  
Accepted: January 16, 2008

**Keywords:**

Host factors (DDX5; DDX3; SFPQ; NXP-2; hnRNP M) / MALDI-TOF MS / RNA-dependent RNA polymerase / Tandem-affinity purification

## 1 Introduction

The genome of the influenza A viruses consists of eight single-stranded RNA molecules of negative polarity (reviewed in ref. [1–3]). Each one is encapsidated by binding to the polymerase complex and to a number of nucleoprotein (NP) monomers [4], forming a ribonucleoprotein (RNP) complex

[5]. Each virus RNP behaves as an independent template for transcription and replication, processes that take place in the nucleus of the infected cell (reviewed in ref. [2]). The enzyme responsible for the synthesis of both genomic and messenger viral RNAs is the virus RNA polymerase, a heterotrimer composed by the PB1, PB2 and PA subunits. The PB1 subunit is the core of the complex and contains the polymerase and endonuclease activities, while PB2 is responsible for cap recognition and PA is a phosphoprotein with protease activity involved in RNA replication (reviewed in ref. [2]). In spite of such a general role distribution among its subunits, the

Correspondence: Dr. Juan Ortín, Centro Nacional de Biotecnología, 28049 Madrid, Spain  
E-mail: jortin@cib.csic.es  
Fax: +34-91-585-4506

Abbreviations: CBD, calmodulin-binding domain; NP, nucleoprotein; RNP, ribonucleoprotein; TAP, tandem-affinity purification; WT, wildtype

\* Current address: Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

\*\*\* Current address: Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA

virus polymerase complex is a very compact structure [6, 7] and mutations in the various subunits may alter either the transcription or replication processes [8, 9].

Upon entry in the infected cell, virion RNPs are first engaged in primary transcription, which is initiated by snatching cellular cap-containing RNAs generated by RNA polymerase II: the viral polymerase associated to the RNP recognizes cellular premRNAs and cleaves them 10–15 nt downstream of the cap, thereby generating cap-containing primers for virus mRNA synthesis [10, 11]. The elongation of the virus transcript is terminated by reiterate copy of an oligo-U signal located close to the 5'-terminus of the template, which results in the synthesis of a 3'-terminal poly-A [12, 13]. Replication of viral RNPs does not require capped primers and proceeds by the synthesis of a positive-strand complementary RNA (cRNA) which is a complete copy of the virion RNA (vRNA) [14]. Both genomic (vRNA) and antigenomic (cRNA) RNAs are encapsidated into RNP structures during replication (reviewed in ref. [2]).

Influenza viruses, as all viruses, are intracellular parasites that rely upon the cell machineries for many aspects of their infection cycle. For virus transcription and replication in particular, influenza RNPs require the interaction with cellular factors that appear to play different roles in these processes. Thus, virus NP interacts with members of the importin alpha protein family [15] and this interaction is important for the translocation of NP and virus RNPs into the nucleus [16, 17]. Other cellular factors were discovered by their capacity to enhance the activity of virus RNPs to synthesize RNA *in vitro* [18, 19]. One of them was identified as the UAP56 splicing factor, that interacts with viral NP [20], while the second one was identified as Hsp90 and was shown to interact with the PB2 subunit of the polymerase complex [21, 22]. Recently, the MCM helicase has been identified as a factor important for the stability of the replication complex [19]. The requirement for cap-snatching during virus transcription initiation is consistent with the recently described association of the virus polymerase with the cellular RNA polymerase II transcription complex [23]. Such interaction could be mediated through binding to the hCLE transcription factor, that was identified in a two-hybrid screen with the PA subunit of the virus polymerase [24, 25]. In addition, the PB1 subunit of the polymerase requires interaction with RanBP5 for efficient transport into the nucleus [26].

In spite of these data, it is important to establish a comprehensive catalogue of the cellular factors interacting with the virus RNA polymerase that would illustrate about all possible roles of the viral enzyme during infection. Therefore, we used a proteomic approach to explore such interactions by expression of the recombinant polymerase complex in human cells, purification and characterisation of the intracellular complexes formed and identification of the cellular associated proteins by mass spectrometry and biochemical analyses. This strategy has allowed the identification of a number of human proteins

involved in several aspects of cellular RNA synthesis, metabolism and transport as influenza RNA polymerase-associated factors.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Biological materials

The HEK 293T [27] cell line was obtained from J. C. de la Torre and was cultivated as described [28]. The HeLa cell line was obtained from the ATCC. The vaccinia recombinant virus vTF7-3 [29] was a gift of B. Moss. Plasmids pGPB1, pGPB2, pGPA and pGNP have been described [30], as well as plasmid pT7NSCATRT [31]. The construction of plasmid pGPB1 TAP, in which the tandem-affinity purification (TAP) tag [32] is fused to the C-terminus of the PB1 ORF was described previously [6]. The generation of plasmid pGPB2-256TAP was as follows: The cDNA encoding the N-terminal 256 amino acids of PB2, previously cloned in pTc plasmid and linked to a C-terminal His tag, was isolated by digestion with ScaI and PflM1 and cloned into pGPB2 plasmid digested with the same enzymes. In this way, plasmid pGPB2-256His was obtained. To substitute the His tag by a TAP tag, plasmid pGPB2-256His was digested with PmeI and SalI and the removed fragment was substituted with a PCR product obtained by amplification of the TAP sequence with specific oligonucleotides containing the same restriction sequences (5'-GCCTAGGTCGACGGATCCATGGAAGAAGAA-3' and 5'-GCTAGCGTTTAACTCAGGTTGACTTC-CCCG-3'). The ORF of NXP-2 gene was amplified by RT-PCR using HeLa cells mRNA and specific oligonucleotides and cloned into pcDNA-HA vector (Invitrogen).

The origin of anti-PB1 serum and anti-PB2 and anti-PA mAb has been described [31, 33, 34]. Anti-SFPQ/PSF and anti-DDX5 were obtained from Abcam. Anti-HA tag and anti-RNA Pol II antibodies were obtained from Covance and Babco, respectively. Antibodies specific for hnRNP M were bought to Santa Cruz and those specific for DDX3 were generated by immunisation of rabbits with peptide DGYGG-NYNSQGVWDWNGN coupled to KLH. The specificity of these antibodies was ascertained by competition with soluble peptide and immunofluorescence assays. Antibodies specific for NP were generated in rabbits using purified His-NP as immunogen.

### 2.2 Expression and purification of virus polymerase

Cultures of HEK 293T cells (10–180 million cells, depending on the experiment) were infected with vTF7-3 virus at a moi of 10 pfu/cell and subsequently transfected with a mixture of plasmids containing (for 10 million cells) either pGPB1 or pGPB1TAP (3 µg), either pGPB2 or pG256PB2TAP (3 µg) and pGPA (0.6 µg) using the calcium phosphate transfection protocol [35]. After incubation for 16–20 h at 37°C, the cells were lysed for 2 h at 0°C in a buffer containing 100 mM Tris-

HCl, 1 mM EDTA, 7.5 mM ammonium sulphate, 0.025% Igepal CA-630 and 1 mM DTT, pH 8, containing RNase A (50 µg/mL) and the complete set of protease inhibitors (Roche). The extract was centrifuged for 15 min at 10 000 × g, diluted ten-fold in IgG-binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal CA-630) and incubated overnight at 4°C with IgG-Sepharose beads (Amersham-Pharmacia). The resin was washed with 50 volumes of the same buffer and further with 25 volumes of TEV cleavage buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal CA-630, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT). The resin was incubated with the optimal amount of TEV protease (Invitrogen), as determined in pilot experiments, for 3 h at room temperature. The digestion products were recovered, diluted with calmodulin-binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl–0.1% Igepal CA-630, 1 mM Imidazol, 1 mM Mg(AcO)<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM 2ME) and incubated overnight at 4°C with calmodulin-agarose (Stratagene). The resin was washed with 100 volumes of the same buffer and the protein retained was eluted with calmodulin-elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal CA-630, 1 mM Imidazol, 1 mM Mg(AcO)<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 10 mM 2ME). In some experiments the concentration of Igepal CA-630 in the column buffers was increased to 0.5%. To test the association of cellular RNA Pol II to the viral polymerase, extracts were prepared according to [23].

To test the activity of TAP-tagged polymerase *in vivo*, recombinant RNPs were generated by transfection of HEK293T cells with plasmids expressing PB1 or PB1TAP, PB2, PA, NP and a genomic plasmid producing a virus-like RNA encoding the CAT gene in negative polarity, as described previously [6]. The levels of CAT protein accumulated were determined by an ELISA-based assay (GE Healthcare), using purified CAT enzyme as standard.

The interaction of NXP-2 protein with the virus polymerase was tested by coexpression *in vivo*. Cultures of HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing PB1 or PB1TAP, PB2, PA and HA-NXP-2. The polymerase was purified by the TAP approach as indicated above and the presence of HA-NXP-2 was determined by Western blot using anti-HA antibodies.

### 2.3 Biochemical analyses

Western blot was carried out as described [36]. The protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon filters. The membranes were saturated with 3% BSA for 1 h at room temperature and incubated with the primary antibodies for 1 h at room temperature. The filters were washed with PBS containing 0.25% Tween 20 and incubated with either antirabbit, antimouse, antigoat or antirat IgG conjugated to HRP. After further washing as above the filters were developed by enhanced chemiluminescence. Silver staining was carried out as follows: the gels were fixed for 60 min with 25% ethanol/10% acetic acid. The fixed gels were soaked for 3 min in 1% nitric acid and 30 min

in sensitising solution (5% w/v sodium thiosulphate, 0.5 M sodium acetate in 30% ethanol). After washing 3 times for 5 min in H<sub>2</sub>O, the gels were incubated with 0.25% silver nitrate and washed twice for 1 min with H<sub>2</sub>O. Reduction was made in 2.96% sodium carbonate, 0.03% formaldehyde. After appropriate development, the reaction was stopped in 10% acetic acid.

For immunofluorescence, cells were infected with the WSN strain of influenza virus at 5 pfu/cell and fixed with 3% paraformaldehyde at various times after infection. When analysing the localisation of NXP2, the cells were transfected with plasmid pcDNA3HA-NXP2 24 h prior to infection. The cultures were permeabilised with 0.5% Triton X-100 and processed for indirect immunofluorescence as described before [37]. The samples were analysed in a Zeiss Axiophot fluorescence microscope equipped with a BioRad confocal unit. Optical sections were acquired sequentially with the LaserSharp software and processed with Laserpix.

### 2.4 Proteomic techniques

Proteins of interest were excised manually from polyacrylamide gels that were stained with PAGE-blue™ (Fermentas) according to the procedure recommended by the manufacturer, deposited in 96-well plates and processed automatically in a Proteiner DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). For protein digestion gel plugs were washed with 50 mM ammonium bicarbonate and treated with ACN before reduction with 10 mM DTT in 25 mM ammonium bicarbonate and alkylation with 55 mM iodoacetamide in 50 mM ammonium bicarbonate. Proteins were digested with modified porcine trypsin (sequencing grade; Promega, Madison, WI) at a final concentration of 15 ng/µL in 25 mM ammonium bicarbonate for 4 h at 37°C. Peptides were eluted from gel pieces with 0.5% TFA in water for 30 min at 25°C [38].

The resulting peptides were analysed by MALDI-TOF MS; 0.5 µL of matrix solution (5 mg/mL 2,5-dihydrobenzoic acid in 33% v/v aqueous ACN and 0.1% v/v TFA) was added onto a 600 µm AnchorChip™ MALDI target (Bruker Daltonics) and allowed to dry at room temperature. A 0.5 µL aliquot of each peptide mixture was then deposited onto matrix spots and dried out at room temperature.

MALDI PMF for each protein was acquired automatically on a Bruker Reflex IV MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) equipped with Scout™ source in positive ion reflector mode; ion acceleration voltage was set as 23 kV. Spectra were acquired by the software FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics) and then processed using the Flex Analysis 2.4 software (Bruker Daltonics). The equipment was first externally calibrated employing protonated mass signals from a peptide mixture covering the 1000–3500 *m/z* range (see Supporting Information). For peak lists generation each spectrum was then internally calibrated with two known trypsin autoprolysis peptides, specifically 842.510 and 2211.105 Da, to reach a typical mass measurement accuracy



of  $\pm 30$  ppm in the 800–3000  $m/z$  range. Also, all known contaminants (other trypsin-derived peptides and keratins) were excluded during the process. The parameters used to analyse the data were an S/N threshold of 20 and the resolution higher than 4000.

## 2.5 Database searches

For protein identification, the measured tryptic peptide masses were batch processed and searched against the non-redundant NCBI database (NCBInr 20050429, containing 2 451 907 sequences and 830 525 235 residues) using the software MASCOT 2.1 (www.matrixscience.com; Matrix Science, London, UK) through the Biotools 2.0 interface (Bruker Daltonics). Search parameters were set as follows: carbamidomethyl cysteine as fixed modification by the treatment with iodoacetamide, oxidised methionines as variable modification, peptide mass tolerance of 80 ppm and one missed cleavage site allowed. In all protein identifications, the probability Mowse scores were greater than the minimum score fixed as significant with a  $p$ -value less than 0.02.

## 3 Results

### 3.1 Expression of the TAP-tagged influenza polymerase in human cells and purification of intracellular polymerase complexes by tandem affinity chromatography

Most of the data available so far about the cellular factors interacting with the influenza virus RNA polymerase have been gathered by either two-hybrid or coimmunoprecipitation screens. Although productive, these approaches have not provided a comprehensive set of cellular proteins that could play a role in the virus infection by means of interaction with the polymerase complex. Therefore, we set out to purify complexes formed intracellularly by the virus polymerase that could preserve the interaction with human cell factors. An optimal experimental design would be to rescue viruses in which affinity purification tags have been introduced into the polymerase subunits. However, such genetic modifications led repetitively to lethal virus phenotypes (data not shown). Hence, we generated recombinant polymerase complexes by coexpression of the three subunits, one of which had been modified by the insertion of an affinity purification tag. The best suited tag for the purposes of this research is the TAP tag, first described for the purification of intracellular complexes in *Saccharomyces cerevisiae* [32], that we have used successfully for the purification of MDa-large complexes containing hStaufen protein in human cells [37]. The TAP tag contains an IgG-binding protein-A domain and a calmodulin-binding domain (CBD) separated by a TEV protease cleavage site. This allows the successive purification by IgG-Sepharose and calmodulin-agarose affinity chromatography as described in detail in Section 2. Since the purifi-

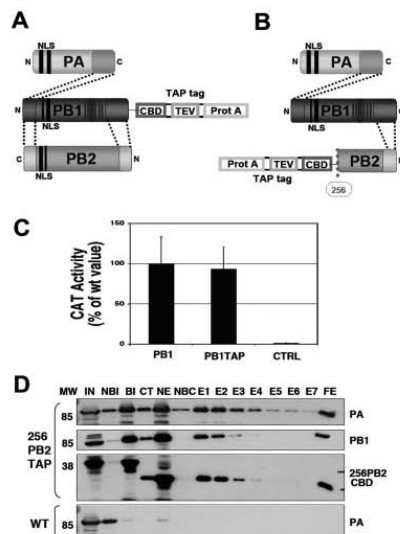
cation is performed under very mild conditions, many of the possible interactions should be maintained, although transient contacts would probably not be registered.

Human HEK293T cells were transfected with constructs expressing each of the virus polymerase subunits, one of which was modified to include a C-terminal TAP tag. Two types of polymerase complexes were prepared: a wild type (WT) complex containing a TAP-tag in the PB1 subunit C-terminus (polPB1TAP) (Fig. 1A) and a mutant complex in which the TAP tag was inserted downstream a C-terminal deleted PB2 subunit (pol256PB2TAP) (Fig. 1B). To test the functionality of TAP-tagged PB1 *in vivo*, recombinant RNPs were generated that contained the CAT gene in negative polarity and the accumulation of CAT was used as a reporter of their biological activity. The results are shown in Fig. 1C and indicate that the polymerase including PB1TAP is fully functional for RNA transcription and replication, in agreement with previous results [6]. The heterotrimer formed with the deleted PB2 subunit is not active for RNA synthesis but has a 3-D structure similar to the WT complex, can recognise specifically the virus template RNA (E. Torreira, unpublished results) and could be expressed in larger amounts [39]. As a control for complex isolation, the WT polymerase complex lacking the TAP tag was expressed and purified in parallel. The TAP process was monitored by Western blot using antibodies specific for each of the polymerase subunits and the results are shown in Fig. 1D for the isolation of pol256PB2-TAP. Similar results were obtained for the isolation of polPB1TAP (data not shown). The cleavage of the 256PB2TAP subunit with TEV protease is apparent in the Western blot anti-PB2 (Fig. 1D; compare the lane B1 with lanes CT or NE). The coelution of all three subunits in the last chromatographic step indicates that the heterotrimer was successfully purified.

The material derived from both TAP-tagged and control polymerase complexes was analysed by 1-D PAGE and silver-staining (Fig. 2). The protein subunits of the polymerase complex (PB1-CBD, PB2 and PA – Fig. 2A or PB1, 256PB2-CBD and PA – Fig. 2B) were apparent, in agreement with the Western blot results presented in Fig. 1D. In addition, other protein bands were detected that were not present, or were present in much reduced amounts, in the isolations from control polymerase complexes, suggesting that these proteins were specifically associated to the viral polymerase.

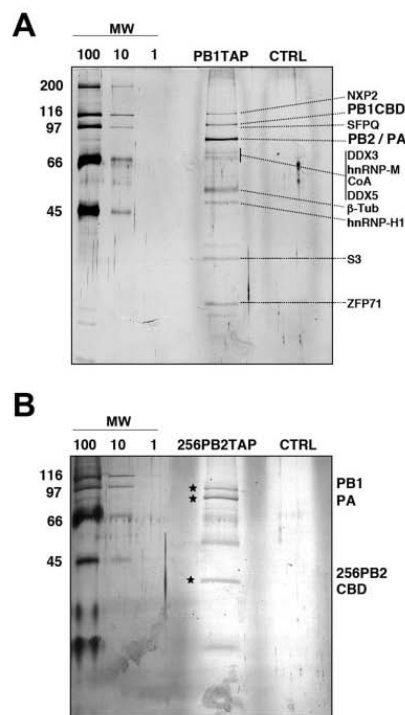
### 3.2 Human proteins involved in cellular RNA synthesis, processing and transport associate with the influenza polymerase complex *in vivo*

To attempt the identification of influenza polymerase associated proteins, preparations of polPB1TAP and pol256PB2-TAP polymerase complexes were obtained by the TAP procedure. Most of the material obtained was separated on 1-D polyacrylamide gels, stained with PAGE-blue and protein bands were excised manually. A small aliquot was purified in parallel, analysed by gel electrophoresis and silver-staining



**Figure 1.** Expression and purification of TAP-tagged influenza polymerase complexes. (A, B) Diagrams showing the general organisation of the polymerase complexes used in this report, (A) polPB1TAP and (B) pol256PB2TAP. The intersubunits interaction domains are indicated by dotted lines. The positions of the nuclear localisation signals for each subunit (NLS) and the polymerase motifs within PB1 (red vertical bars) are also indicated. The interaction between the N-terminal regions of PB1 and PB2 is depicted as suggested in ref. [66, 67]. The structure of the TAP tag is also shown, with the CBD, the TEV cleavage site (TEV) and the IgG-binding domain (ProtA). (C) Assay of the biological activity of TAP-tagged or untagged RNPs. Recombinant RNPs were generated using either PB1TAP or PB1 and a viral minireplicon encoding the CAT gene in negative polarity. The results are presented as averages and SDs of three independent experiments. As negative control, the plasmid expression PB1 subunit was omitted during transfection. (D) Analysis of the purification of recombinant pol256PB2TAP complex by Western blot using anti-PA, anti-PB1 and anti-PB2 antibodies. Also shown is the analysis of a control purification of untagged polymerase complex, using anti-PA antibodies. The purification fractions analysed were as follows: Input extract (IN), material not bound to IgG (NB1), material bound to IgG (BI), material cleaved with TEV protease (CT), material not eluted from IgG (NE), material not bound to calmodulin-agarose (NBC), elutions from calmodulin-agarose (E1–E7) and material not eluted from calmodulin-agarose (FE).

and the protein pattern is presented in Fig. 2. For the identification of the associated proteins, individual gel bands were digested in-gel with trypsin and the resulting tryptic peptides were analysed by MALDI-TOF MS, as detailed in Section 2.



**Figure 2.** Analysis of purified influenza polymerase complexes. Silver-staining of purified polPB1TAP (A) and pol256PB2TAP (B) complex. Aliquots of the materials purified were separated by PAGE and silver staining. The position of the polymerase subunits (PB1CBD, PB2, PA) (A) and (PB1, PA, 256PB2CBD) is indicated on the right. The assignment of the associated protein bands is indicated (see Table 2). Molecular weight markers ( $M_w$ ) (100, 10 and 1 ng per protein band) were included in the gel. Their mobility is indicated on the left.

As the preparations obtained for polPB1TAP were 10–20 times less abundant than for pol256PB2TAP, reliable identifications were only obtained for the latter. The polymerase subunits expressed and purified were correctly identified, as expected. Thus, all identified proteins provided an appropriate MASCOT score (Table 1). The best identification for the deleted 256PB2 subunit corresponded to an N-terminal fragment of PB2 (Table 1; gi|40795579), as the mouse scores for full-length PB2 entries were much lower. Identifications were also obtained for many, but not all, bands excised cor-

**Table 1.** MS data of the influenza A virus polymerase complex

Accession no. <sup>a)</sup>	Protein name	$M_r$ <sup>b)</sup>	No. masses searched	No. masses matched	Sequence coverage%	MASCOT score <sup>c)</sup>	<i>p</i> -value
gi 3721960	PA polymerase subunit (influenza A virus H3N2)	83 637	21	13	19	108	3.3e – 5
gi 324942	Polymerase basic 1 PB1 (influenza A virus (A/Ann Arbor/6/1960) (H2N2)	86 958	22	18	20	166	9.6e – 11
gi 40795579	Polymerase 2 (influenza A virus (A/chicken/EI Salvador/102711-1/01) (H5N2) fragment	26 119	10	7	32	83	0.0015

a) NCBI accession number.

b) Theoretical molecular mass.

c) Probability based Mowse scores.

**Table 2.** MS data of the associated partners

Accession no. <sup>a)</sup>	Protein name	$M_r$ <sup>b)</sup>	No. masses searched	No. masses matched	Sequence coverage%	MASCOT score <sup>c)</sup>	<i>p</i> -value
gi 1469195	KIAA0136 (NXP2)	109 488	11	8	10	83	0.0006
gi 38014635	SFPQ/PSF protein	76 255	22	9	14	68	0.025
gi 13514817	DEAD/H box polypeptide 3 (DDX3)	73 625	22	11	19	99	0.0003
gi 14141154	HNRNP-M protein	73 430	22	12	21	91	0.0018
gi 15022507	Coactivator activator	69 634	30	9	17	70	0.014
gi 226021	Growth regulated nuclear 68 protein (DDX5)	67 394	20	14	26	198	3.9e – 14
gi 18088719	Beta 5-tubulin	50 096	36	15	23	104	1.1e – 5
gi 48145673	HNRNP-H1 protein	49 384	34	14	37	142	1.5e – 8
gi 306553	Ribosomal protein small subunit S3	30 208	13	8	24	90	0.00014
gi 51767781	Similar to zinc finger protein 71, related sequence 1	19 010	19	7	39	90	0.0026

a) NCBI accession number.

b) Theoretical molecular mass.

c) Probability-based Mowse scores.

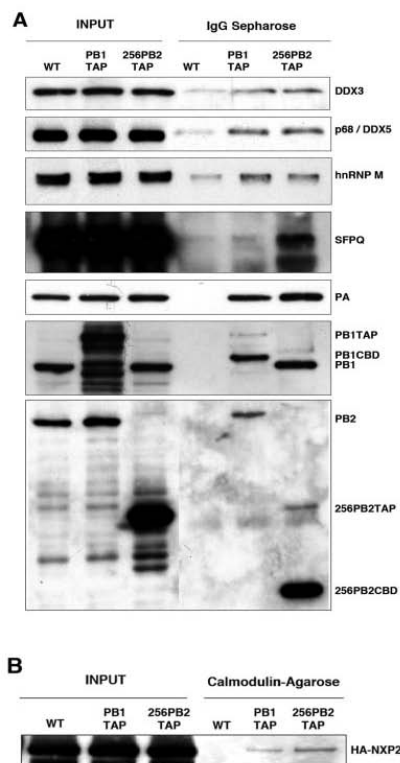
responding to polymerase-associated proteins. The results are presented in Table 2. Again, the MASCOT scores obtained were significant with  $p < 0.02$  and the theoretical mass of the identified proteins was compatible with the mobility of the protein bands excised from the PAGE-blue-stained gel, as depicted in Fig. 2. The complete proteomic results are presented as Supporting Information.

To validate the results obtained by mass spectrometry, the association of some of the proteins identified to the polymerase complex was ascertained by Western blot analysis with specific antisera. Only reagents appropriate to test DDX3, p68(DDX5), SFPQ and hnRNP M could be obtained and were used to probe the presence of these proteins after the first affinity purification step in the TAP protocol. The results are presented in Fig. 3A and show that in every case was it possible to detect the copurification of the identified proteins with both pol256PB2TAP as well as polPB1TAP complexes. The interaction of NXP-2 protein with the poly-

merase complex was confirmed by coexpression of the polPB1TAP, pol256PB2TAP or WT polymerase complexes with HA-tagged NXP-2 protein. As presented in Fig. 3B, a specific association of HA-NXP-2 protein with both recombinant polymerase complexes was observed after TAP purification.

### 3.3 Specific polymerase-interacting proteins colocalise with viral RNPs in influenza-virus infected cells

To evaluate the relevance of the polymerase-interacting factors identified here for virus infection, human HeLa cell cultures were infected with the WSN strain of influenza virus at high multiplicity of infection and fixed at various times thereafter. The cultures were double-labelled with antibodies specific for each of the polymerase-associated proteins and for NP as a marker of RNPs in the infection. In this way, we



**Figure 3.** Western blot analyses of the interaction of influenza polymerase and human cell factors. (A) WT polymerase, polPB1-TAP or pol256PB2TAP were purified by the first step of the TAP approach as indicated in Section 2 and the legend to Fig. 1. The presence of each polymerase subunit was verified by Western blot using subunit-specific antibodies and is shown in the three bottom panels of the figure. Aliquots of the INs and the material eluted from IgG-Sepharose by TEV cleavage were analysed by Western-blot with specific antibodies and the results are presented in the top four panels. The position of the specific bands is indicated to the right. (B) WT polymerase, polPB1TAP or pol256PB2TAP were coexpressed with HA-NXP-2 protein and TAP-purified. The presence of copurified HA-NXP-2 is shown by Western blot using anti-HA antibodies.

intended to visualise the interaction with the RNP-associated polymerase and potentially reflect possible implications of the cellular factors with the RNA replication, transcription

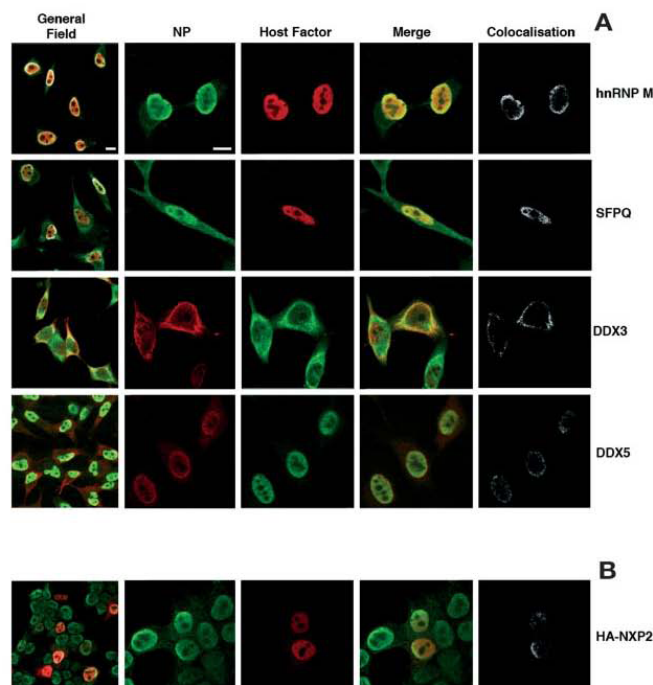
and transport events during the infection. As presented in Fig. 4, all associated proteins that could be tested in this way showed colocalisation with viral RNPs at some time after infection. The results shown in Fig. 4A were obtained with antibodies specific for hnRNP M, SFPQ, DDX3 and p68/DDX5, whereas the localisation of NXP-2 was analysed after transfection with an HA-tagged NXP-2 cDNA (Fig. 4B). Most of the associated factors showed a localisation mainly in the nucleus (hnRNP M, SFPQ, NXP-2 and p68/DDX5) and were found to colocalise with viral RNPs within this cellular compartment at 4 hpi, a time at which viral RNA replication and transcription rate is maximal [40, 41]. At such a time after infection, viral NP was found all over the nucleus, with somewhat higher concentration in the nuclear periphery and most colocalisation signal was detected at these sites (Fig. 4A and B; colocalisation panels). Such colocalisation was apparent from the time the NP marker was detectable in the nucleus up to the point when viral RNPs were exported to the cytoplasm. The localisation of DDX3 was mainly cytoplasmic, as has been reported [42] and found to colocalise with viral RNPs in this compartment later in the infection cycle (Fig. 4A). Thus, colocalisation was only detected in cells in which the virus RNPs have been already exported to the cytoplasmic compartment (see Fig. 4A, left panel, arrow). These results indicate that the interaction observed between the influenza polymerase and the host factors identified here by a proteomic approach is not a mere artefact of the TAP purification technique and occurs also in the course of virus infection.

#### 4 Discussion

The influenza polymerase complex is responsible for virus RNA replication and transcription and is present in infected cells, both associated to virus RNPs and as a soluble heterotrimer [43]. In this report we have used overexpression of the polymerase from cloned cDNAs to attempt the identification of the set of cellular polymerase-interacting proteins by a proteomic approach. Several evidences supported the efficient formation of heterotrimeric complexes *in vivo* by this approach: (i) the analyses of the purification process revealed the copurification of the three subunits (Fig. 1D), (ii) previous results from our group [6] as well as the data presented in Fig. 1C indicated that the WT complex formed (polPB1-TAP) drive the efficient replication of RNPs *in vivo*. Although the deleted complex pol256PB2TAP can not transcribe virus RNA *in vitro*, it still can bind efficiently and specifically the viral template (E. Torreira, unpublished results) and (iii) most of the material purified by the TAP approach showed a size compatible with that expected for the heterotrimeric complex [44].

The protein content of polymerase-expressing cultures was extracted extensively to allow the isolation of complexes located within the cell nucleus and the tagged polymerase was purified under very mild conditions by means of the TAP





**Figure 4.** Localisation of human host factors in influenza virus-infected cells. Cultures of HeLa cells (A) or HEK293T cells (B) were infected with the WSN strain of influenza virus and fixed at various times after infection. (A) The preparations were analysed by double-label immunofluorescence using anti-NP antibodies and antibodies specific for the polymerase associated factors indicated. (B) For the analysis of NXP-2 protein, HA-tagged protein was expressed by transfection 24 h prior to infection and the protein was monitored with anti-HA antibodies. For each host factor, indicated to the right of each row, 5 panels are presented: A general view of a low-magnification field (general field) including the NP and host factor signals, as well as the colocalisation signal (white). Higher magnification images showing the NP signal (NP), the host factor signal (host factor), the superposition of both (merge) and the colocalisation signal (colocalisation). The bars indicate 10 µm.

approach. Previous experience in our group had shown that it is possible to isolate MDa-large complexes using this strategy with very low carry-over of unspecific cellular proteins [37]. This was also the case here, as indicated by the low background of unspecific cellular proteins obtained in the purification of untagged polymerase (Fig. 2). Although the purification was performed under the mildest possible conditions compatible with the removal of unspecific contaminants, the presence of transient polymerase interactors in the complexes is not to be expected, i.e. only stable associations to human factors should be detected in this analysis.

The study of the proteins associated to the polymerase by MALDI-TOF led to the identification of a series of human factors as indicated in Table 2. However, not all protein bands studied yielded acceptable identifications and therefore the list of potential polymerase-interacting factors is not yet complete. In this regard a recent publication that appeared while this manuscript was in preparation describes additional polymerase-associated cellular factors [45]. Whenever possible, the proteomic identifications were verified in repeated purification experiments by Western blot analyses using specific antibodies (Fig. 3), but this was not possible for all identified proteins. In general, the Western blot sig-



nals were less intense for the purifications of polPB1TAP, due to the lower yield in the expression of the WT complex, and for some of the proteins tested the signals were only marginally above the background of untagged polymerase, although they were repetitively so. Furthermore, the relevance of the factors identified was verified by colocalisation experiments in virus infected cells (Fig. 4).

Among the factors identified from the polymerase-containing complexes most were nuclear proteins, as expected for an enzyme that transcribes and replicates virus RNA in the nucleus, but some typically cytosolic proteins were also detected (Table 2). Although the human factors reported previously as associated to the virus polymerase [21, 23, 24] were not identified in the proteomic approach, the presence of cellular RNA polymerase II in the purified complexes was detected by Western blot (see Supporting Information Fig. S1). It is possible that interaction with Hsp90 or hCLE proteins is not stable enough or represent a minor proportion of the possible complexes formed and hence could not be detected.

The nuclear factors identified were all related to cellular RNA synthesis, modification and transport. Thus, NXP-2 is a nuclear matrix-associated protein involved in transcription repression [46, 47] that might play a role in influenza virus RNA replication, as this takes place in association to the nuclear matrix [48, 49]. This is further supported by the colocalisation of viral RNPs with HA-NXP2 in the nucleus of infected cells (Fig. 4B). Several factors identified are related to cellular mRNA synthesis or splicing: Two hnRNP components were recognised, hnRNP M, that binds to nascent RNA polymerase II transcripts [50] and hnRNP H1, that is involved in mRNA splicing [51]. Two additional factors identified, SFPQ/PSF and p68/DDX5, have dual roles in the cell, in the transcription and splicing processes: SFPQ (Splicing Factor Proline and Glutamine-rich)/PSF associates to the CTD in RNA polymerase II [52] and is involved in the formation of the spliceosome. p68/DDX5 activates or represses transcription depending on the transcription factor which drives RNA synthesis [53, 54] and plays a role in the early steps of spliceosome assembly [55, 56] as well as in ribosome biogenesis [57]. The interaction of these human factors with the influenza virus polymerase might be relevant, as it has been described that it can coimmunoprecipitate with the RNA polymerase II complex [23] and some of the viral mRNAs need to be spliced for full virus gene expression. Indeed, these factors colocalised with viral RNPs in the nucleus of infected cells (Fig. 4). In addition, some of these factors have been found associated to other virus RNAs or polymerases. Thus, p68/DDX5 associates to the hepatitis C virus RNA polymerase [58] and DDX3 is important for the nuclear export of HIV unspliced mRNAs [42]. The hepatitis C virus 3'-conserved RNA sequence interacts with P68/DDX5, DDX3, SFPQ/PSF and hnRNPM [59], while the SFPQ/PSF protein binds to the hepatitis delta virus RNA [60].

Especially interesting might be the interaction of the influenza polymerase complex with DDX3. Like p68/DDX5, DDX3 is a DEAD-box RNA helicase, a family of proteins involved in the remodelling of RNA secondary structures in cellular RNPs and promoting or altering RNA-protein interactions. DDX3 in particular is a nucleocytoplasmic shuttling protein that associates to the nuclear pores, binds to CRM1 exportin and plays an important role in the CRM1 export pathway [42]. In addition, DDX3 has been found in neuronal RNA-containing granules involved in mRNA transport [61, 62]. These RNA granules also contain hStaufen [37, 62], a dsRNA-binding protein important for intracellular mRNA localisation that was identified by its interaction with influenza virus NS1 protein [63]. SFPQ/PSF protein [62] and hCLE/CG199, a transcription regulator identified as an influenza virus polymerase-interacting factor [24, 25, 62]. The roles proposed for DDX3 in RNA nuclear export and in cytoplasmic mRNA localisation as well as its interaction with the influenza virus polymerase suggest that the latter may be involved in functions distinct from viral RNA replication and transcription during the infection cycle. This would be consistent with the cytoplasmic colocalisation of DDX3 and virus RNPs in virus-infected cells (Fig. 4A). For example, it is not known whether the cellular cap-binding complex (CBC) associates to the cap structure in viral mRNAs or, alternatively, the viral polymerase acts as a viral CBC. Likewise, the pathway utilised by viral mRNAs, most of which are not spliced, for nucleo-cytoplasmic export is not known and it has been recently described that the association of DDX3 and DDX5 to mRNAs depends on previous splicing [64]. In this regard it is important to mention that the influenza polymerase is able to bind to the 5'-proximal sequences of the viral mRNAs [65], in a cap- and sequence-specific manner.

The proteomic approach used allowed the recognition of an interaction of the virus polymerase with the S3 component of the 40S subunit of the ribosome that may have implications in the translation of viral mRNAs. Finally, the interaction of viral polymerase with tubulin may be involved in the long-distance transport of virus RNPs from the nucleus to the vicinity of the cell membrane, prior to virion formation and budding.

In summary, the purification of complexes formed intracellularly by recombinant influenza polymerase and the proteomic analysis of their components has unravel a long list of human factors able to interact with the viral polymerase, most of which are nuclear proteins involved in cellular RNA synthesis, modification and transport. Further experiments will be required to analyse the functional implications of these interactions for the different steps in the viral infection cycle.

*We thank A. H. Patel for providing biological materials, F. Roncal for peptide synthesis and L. Ver and J. A. Melero for the preparation of antisera. The technical assistance of Y. Fernández and S. Gutierrez is gratefully acknowledged. N. J. was a fellow*

from Ministerio de Educación y Ciencia. E. T. was a fellow from Instituto de Salud Carlos III. P. G. was a fellow from Gobierno Vasco. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Ministerio de Educación y Ciencia) (grant BFU2004-491), the VIRHOST Program financed by Comunidad de Madrid, European Vigilance Network for the Management of Antiviral Drug Resistance (VIRGIL) and the FLUPOL strep project (SP5B-CT-2007-044263).

The authors have declared no conflict of interest.

## 5 References

- Lamb, R. A., Krug, R. M., in: Howley, P. M. (Ed.), *Fields Virology*, 4th Edn., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001, pp. 1487–1531.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L., Ortín, J., in: Kawaoka, Y. (Ed.), *Current Topics in Influenza Virology*, Horizon Scientific Press, Norfolk 2005, pp. 1–92.
- Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E., Kawaoka, Y., Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2004, **283**, 121–143.
- Klump, K., Ruigrok, R. W., Baudin, F., Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J.* 1997, **16**, 1249–1257.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O. *et al.*, Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.* 2001, **2**, 313–317.
- Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E. *et al.*, Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: Localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, **101**, 308–313.
- Torreira, E., Schoehne, G., Fernández, Y., Jorba, N. *et al.*, Three-dimensional model for the isolated influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res.* 2007, **35**, 3774–3783.
- Gastaminza, P., Perales, B., Falcón, A. M., Ortín, J., Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J. Virol.* 2003, **76**, 5098–5108.
- Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., Deng, T. *et al.*, A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J. Virol.* 2002, **76**, 8989–9001.
- Krug, R. M., Broni, B. A., Bouloy, M., Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized *in vivo* donated by host mRNAs? *Cell* 1979, **18**, 329–334.
- Bouloy, M., Plotch, S. J., Krug, R. M., Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**, 4886–4890.
- Robertson, J. S., Schubert, M., Lazzarini, R. A., Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J. Virol.* 1981, **38**, 157–163.
- Poon, L. L. M., Pritlove, D. C., Fodor, E., Brownlee, G. G., Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J. Virol.* 1993, **73**, 3473–3476.
- Hay, A. J., Skehel, J. J., McCauley, J., Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* 1982, **116**, 517–522.
- O'Neill, R. E., Palese, P., NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology* 1995, **206**, 116–125.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., Moroliaru, J., Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 22701–22704.
- Cros, J. F., García-Sastre, A., Palese, P., An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 2005, **6**, 205–213.
- Momose, F., Handa, H., Nagata, K., Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* 1996, **78**, 1103–1108.
- Kawaguchi, A., Naito, T., Nagata, K., Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J. Virol.* 2005, **79**, 732–744.
- Momose, F., Basler, C. F., O'Neill, R. E., Iwamatsu, A. *et al.*, Cellular splicing factor RAF-2p49/NPI-5/BAT1/JAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J. Virol.* 2001, **75**, 1899–1908.
- Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S. *et al.*, Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 45306–45314.
- Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A., Nagata, K., Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J. Virol.* 2007, **81**, 1339–1349.
- Engelhardt, O. G., Smith, M., Fodor, E., Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* 2005, **79**, 5812–5818.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortín, J., Nieto, A., PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* 2001, **75**, 8597–8604.
- Perez-Gonzalez, A., Rodríguez, A., Huarte, M., Salanueva, I. J., Nieto, A., hCLE/CGI-98, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J. Mol. Biol.* 2006, **362**, 887–900.
- Deng, T., Engelhardt, O. G., Thomas, B., Akoulitchev, A. V. *et al.*, The role of Ran Binding Protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J. Virol.* 2006, **80**, 11911–11919.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M. *et al.*, Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 1987, **7**, 379–387.
- Ortín, J., Nájera, R., López, C., Dávila, M., Domingo, E., Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: Spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* 1980, **17**, 319–331.
- Fuerst, T. R., Earl, P. L., Moss, B., Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol. Cell. Biol.* 1987, **7**, 2538–2544.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martín, J. *et al.*, Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vac-

- cínia-T7 RNA polymerase expression system. *J. Gen. Virol.* 1994, **75**, 2103–2114.
- [31] Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J. M. *et al.*, Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J. Virol.* 2000, **74**, 156–163.
  - [32] Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M. *et al.*, A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 1999, **17**, 1030–1032.
  - [33] Bárcena, J., Ochoa, M., de la Luna, S., Melero, J. A. *et al.*, Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis *in vitro*. *J. Virol.* 1994, **68**, 6900–6909.
  - [34] Ochoa, M., Bárcena, J., de la Luna, S., Melero, J. A. *et al.*, Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res.* 1995, **37**, 305–315.
  - [35] Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R. *et al.*, DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, **76**, 1373–1376.
  - [36] Marión, R. M., Zürcher, T., de la Luna, S., Ortín, J., Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 1997, **78**, 2447–2451.
  - [37] Villacé, P., Marión, R. M., Ortín, J., The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2004, **32**, 2411–2420.
  - [38] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, **68**, 850–858.
  - [39] Torreira, E., Estructura tridimensional de complejos heterotriméricos de la polimerasa del virus de la gripe. Doctoral Thesis. Universidad Autónoma de Madrid 2006.
  - [40] Falcón, A. M., Marión, R. M., Zürcher, T., Gómez, P. *et al.*, Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive [A/Victoria/3/75] influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J. Virol.* 2004, **78**, 3880–3888.
  - [41] Garaigorta, U., Falcon, A. M., Ortín, J., Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: A temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J. Virol.* 2005, **79**, 15246–15257.
  - [42] Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., Jeang, K. T., Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 2004, **119**, 381–392.
  - [43] Detjen, B. M., St Angelo, C., Katze, M. G., Krug, R. M., The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J. Virol.* 1987, **61**, 16–22.
  - [44] Jorba, N., Area, E., Ortín, J., Oligomerisation of the influenza virus polymerase complex *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 2008, **89**, 520–524.
  - [45] Mayer, D., Molawi, K., Martínez-Sobrido, L., Ghanem, A. *et al.*, Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J. Proteome Res.* 2007, **6**, 672–682.
  - [46] Kimura, Y., Sakai, F., Nakano, O., Kasaki, O. *et al.*, The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 20611–20617.
  - [47] Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E. *et al.*, NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, **103**, 5308–5313.
  - [48] Jackson, D. A., Caton, A. J., McCready, S. J., Cook, R. R., Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* 1982, **296**, 366–368.
  - [49] López-Turiso, J. A., Martínez, C., Tanaka, T., Ortín, J., The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res.* 1990, **16**, 325–337.
  - [50] Kafasla, P., Patrino-Georgoula, M., Lewis, J. D., Gualis, A., Association of the 72/74-kDa proteins, members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M group, with the pre-mRNA at early stages of spliceosome assembly. *Biochem. J.* 2002, **363**, 793–799.
  - [51] Chou, M. Y., Rooke, N., Turck, C. W., Black, D. L., hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* 1999, **19**, 69–77.
  - [52] Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W. *et al.*, Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA* 2002, **8**, 1102–1111.
  - [53] Bates, G. J., Nicol, S. M., Wilson, B. J., Jacobs, A. M. *et al.*, The DEAD box protein p68: A novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J.* 2005, **24**, 543–553.
  - [54] Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K. *et al.*, A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.* 2001, **20**, 1341–1352.
  - [55] Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., Huang, Y., Liu, Z. R., ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 2005, **25**, 7484–7493.
  - [56] Liu, Z. R., p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol. Cell. Biol.* 2002, **22**, 5443–5450.
  - [57] Jalal, C., Uhlmann-Schifflier, H., Stahl, H., Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res.* 2007, **37**, 3590–3601.
  - [58] Goh, P. Y., Tan, Y. J., Lim, S. P., Tan, Y. H. *et al.*, Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J. Virol.* 2004, **78**, 5268–5286.
  - [59] Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B., Pandey, V. N., Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, **5**, 1008–1018.
  - [60] Greco-Stewart, V. S., Thibault, C. S., Pelchat, M., Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA. *Virology* 2006, **356**, 35–44.

- [61] Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X. K. *et al.*, Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, **5**, 635–651.
- [62] Kanai, Y., Dohmae, N., Hirokawa, N., Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 2004, **43**, 513–525.
- [63] Marión, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., Ortín, J., A human sequence homologue of stauferin is an RNA-binding protein that localizes to the polysomes of the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 1999, **19**, 2212–2219.
- [64] Merz, C., Urlaub, H., Will, C. L., Luhrmann, R., Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *RNA* 2007, **13**, 116–128.
- [65] Shih, S. R., Krug, R. M., Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: Selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* 1996, **226**, 430–435.
- [66] Biswas, S. K., Nayak, D. P., Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J. Virol.* 1996, **70**, 6716–6722.
- [67] Poole, E., Elton, D., Madcalif, L., Digard, P., Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: Identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* 2004, **321**, 120–133.



# The Host-Dependent Interaction of $\alpha$ -Importins with Influenza PB2 Polymerase Subunit Is Required for Virus RNA Replication

Patricia Resa-Infante<sup>1,2\*</sup>, N ria Jorba<sup>1,2\*</sup>, Noelia Zamarreño<sup>1,2</sup>, Yolanda Fernández<sup>1,2</sup>, S lvia Juárez<sup>1,2</sup>, Juan Ort n<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) Darwin 3, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain, <sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias, Mallorca, Illes Balears

## Abstract

The influenza virus polymerase is formed by the PB1, PB2 and PA subunits and is required for virus transcription and replication in the nucleus of infected cells. As PB2 is a relevant host-range determinant we expressed a TAP-tagged PB2 in human cells and isolated intracellular complexes. Alpha-importin was identified as a PB2-associated factor by proteomic analyses. To study the relevance of this interaction for virus replication we mutated the PB2 NLS and analysed the phenotype of mutant subunits, polymerase complexes and RNPs. While mutant PB2 proteins showed reduced nuclear accumulation, they formed polymerase complexes normally when co expressed with PB1 and PA. However, mutant RNPs generated with a viral CAT replicon showed up to hundred-fold reduced CAT accumulation. Rescue of nuclear localisation of mutant PB2 by insertion of an additional SV40 Tag-derived NLS did not revert the mutant phenotype of RNPs. Furthermore, determination of recombinant RNP accumulation in vivo indicated that PB2 NLS mutations drastically reduced virus RNA replication. These results indicate that, above and beyond its role in nuclear accumulation, PB2 interaction with  $\alpha$ -importins is required for virus RNA replication. To ascertain whether PB2- $\alpha$ -importin binding could contribute to the adaptation of H5N1 avian viruses to man, their association in vivo was determined. Human alpha importin isoforms associated efficiently to PB2 protein of an H3N2 human virus but bound to diminished and variable extents to PB2 from H5N1 avian or human strains, suggesting that the function of alpha importin during RNA replication is important for the adaptation of avian viruses to the human host.

**Citation:** Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreño N, Fernández Y, Juárez S, et al. (2008) The Host-Dependent Interaction of  $\alpha$ -Importins with Influenza PB2 Polymerase Subunit Is Required for Virus RNA Replication. PLoS ONE 3(12): e3904. doi:10.1371/journal.pone.0003904

**Editor:** Wang-Shick Ryu, Yonsei University, Republic of Korea

**Received:** August 19, 2008; **Accepted:** November 11, 2008; **Published:** December 10, 2008

**Copyright:**   2008 Resa-Infante et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** N.J. and P.R.I. were fellows from Ministerio de Educación y Ciencia and Consejo Superior de Investigaciones Científicas, respectively. This work was funded by Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-491 and BFU2007-60046), European Union: (VIRGIL) (FP6-503359) and (FLUPOL) (SP5B-CT-2007-044263) and Comunidad de Madrid (MIRHOST) (S-SAL-0815-2006).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: jortin@cnb.csic.es

  These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Transcription and replication of influenza A virus is carried out in the nucleus of the infected cells by each of the eight ribonucleoprotein particles (RNPs) that constitute their genome (reviewed in [1–3]). Each RNP contains one single-stranded RNA segment encapsidated by binding to nucleoprotein (NP) monomers and the polymerase complex [4], a heterotrimer containing the PB1, PB2 and PA subunits. Within the RNP, the viral RNA polymerase is the enzyme responsible for transcription and replication. The PB1 subunit is responsible for the polymerase and endonuclease activities, PB2 binds the cap structure of cellular pre-mRNAs and PA is a phosphoprotein with protease activity involved in RNA replication (reviewed in [1,2]). These subunits form a tight and stable complex whose low-resolution structure has been determined by electron microscopy and image processing [5,6]. The PB1 subunit is the core of the complex and interacts with both PB2 and PA, whereas no interaction between PB2 and PA proteins has been described. Each polymerase subunit can be translocated to the nucleus as they contain nuclear localisation signals (NLSs) [7–9] and

the precise structure of the PB2 NLS has recently been determined by co-crystal formation with importin  $\alpha 5$  [10]. However, the intracellular site and the pathway for complex formation are not clear at present. It has been proposed that the PB1-PA dimer would be formed in the cytoplasm and transported to the nucleus whereas PB2 would be transported independently [11,12]. The PB1-PA dimer and PB2 would then form the heterotrimer in the nucleus, as supported by in vitro assembly reactions [13]. Alternative proposals are based on the formation of Hsp90 complexes with PB1 and PB2 and suggest the formation of PB1-PB2 and PB1-PA dimers and their co-transport to the nucleus [14,15].

In this report we have studied the role in the infection of influenza PB2 subunit by proteomic analysis of intracellular complexes containing PB2 and mutation of the recently described NLS [10]. We found  $\alpha$ -importins as PB2-associated host factors and showed that they bind efficiently to PB2 derived from a human virus but associate to a diminished and isoform-specific way to PB2 from H5N1 avian viruses. Although polymerase complex formation was not affected by mutation of PB2 NLS, RNP activity was essentially abolished. Restoring nuclear import

by ectopic addition of a SV40 Tag NLS did not rescue the RNP biological activity, suggesting that PB2 interaction with  $\alpha$ -importin is required for the biological activity of influenza polymerase, in addition to its role in protein transport. Furthermore, mutation of PB2 NLS abrogated the capacity of recombinant RNPs to accumulate in vivo, indicating that the interaction of importin  $\alpha$  with the natural NLS in PB2 is necessary for viral RNA replication.

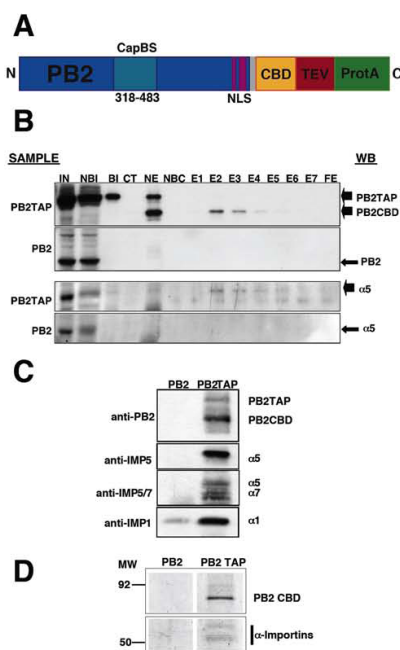
## Results

### Importins $\alpha$ associate in vivo with the influenza polymerase PB2 subunit

To determine the human host factors that associate in vivo with the PB2 subunit of the influenza RNA polymerase we expressed a TAP-tagged version of the protein (Fig. 1A) by transfection of human cells and purified the intracellular complexes formed in vivo by tandem affinity chromatography as described [16]. As a control, untagged PB2 was expressed and purified in parallel. MS-MS analysis of the purified complexes identified the presence of importin  $\alpha 5$ , in addition to the purified PB2 subunit (Tables S1 and S2). To verify biochemically these results, the purified PB2-containing complexes were analysed by Western-blot with  $\alpha$ -importin-specific antibodies. The results presented in Fig. 1B, C show the co-purification of importin  $\alpha 5$  with PB2 and the in vivo association of importins  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$  and  $\alpha 7$  with PB2. These results are consistent with the co-crystallisation of importin  $\alpha 5$  with the NLS-containing C-terminal domain of PB2 protein [10] and the co-localisation of importin  $\alpha 1$  with PB2 in influenza virus-infected cells [17]. The accepted mechanism for nuclear import implies that importin-cargo interaction is transient and is eliminated once the nuclear envelope barrier is overcome. The fact that it is possible to isolate stable intracellular complexes of PB2 and importin  $\alpha$  (Fig. 1D) would suggest that such interaction might have a biological role other than the expected for PB2 nuclear import.

### Mutations in the NLS of PB2 do not alter polymerase complex formation but abolish the activity of viral RNPs

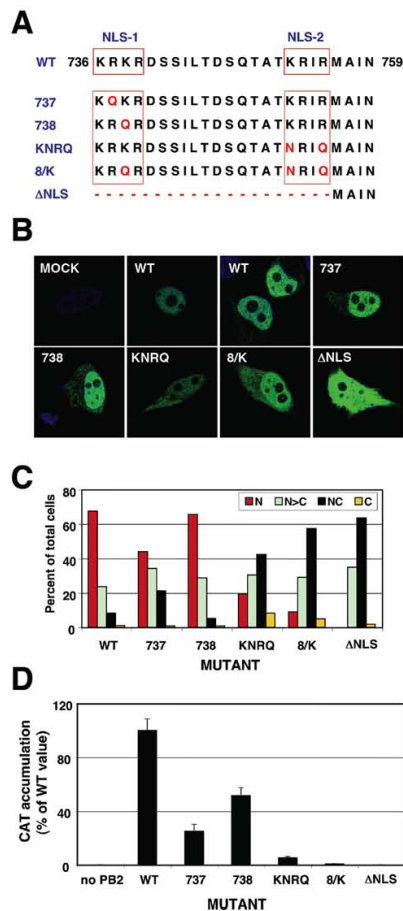
To study the possible functions of PB2-importin  $\alpha$  interactions we generated PB2 mutants altered in the bipartite NLS. Mutants in NLS-1 (R737Q -mutant 737- or K738Q -mutant 738-) in NLS-2 (K752N+R755Q -mutant KNRQ-) or in both regions (K738Q+K752N+R755Q -mutant 8/K-) were generated. These mutations were described previously on the basis of the co-crystal structure of PB2 NLS domain bound to alpha importin and progressively decreased the interaction of PB2 with the importin [10]. In addition, a deletion mutant in which the complete NLS was eliminated was also produced -mutant  $\Delta$ NLS- (Fig. 2A). After verifying that all mutant PB2 proteins were expressed correctly (Fig. S1), their nuclear import in HeLa cells was tested by indirect immunofluorescence using PB2-specific antibodies. Representative images are presented in Fig. 2B and a summary of the phenotypes is shown in Fig. 2C. The results are consistent with those reported for the mutant C-terminal domain of PB2 fused to GFP [10] and indicate that nuclear accumulation of untagged PB2 protein is slightly affected by single-point mutations in NLS1 and more inhibited by a double mutation in NLS2. Thus, only slight PB2 cytoplasmic staining was apparent in the 737 or 738 mutants, while mutants KNRQ and 8/K had similar concentrations of PB2 in the nucleus and the cytoplasm. Even mutant  $\Delta$ NLS showed some nuclear staining. Similar phenotypes were observed in HEK293T cells (Fig. S2). The biological activity of these mutants was first tested in a RNP replication system using a CAT gene-containing viral replicon. Cells were transfected with plasmids



**Figure 1. Purification of PB2-containing intracellular complexes.** (A) Diagram of the PB2TAP recombinant protein. The structure of the C-terminal TAP tag is shown, with the calmodulin-binding domain (CBD), the TEV cleavage site (TEV) and the IgG-binding domain (ProtA). Also marked are the cap-binding domain (CapBS) [41], and the NLS [10]. (B) Analysis of the purification of recombinant PB2TAP or control PB2 protein by Western-blot. Also shown is the co-purification of  $\alpha$ -importin using anti-importin antibodies. The purification fractions analysed were as follows: Input extract (IN), material not bound to IgG (NBI), material bound to IgG (BI), material cleaved with TEV protease (CT), material not eluted from IgG (NE), material not bound to calmodulin-agarose (NBC), elutions from calmodulin-agarose (E1–E7) and material not eluted from calmodulin-agarose (FE). The material used for each purification is indicated on the left (Sample), whereas the position of the Western-blot signals (WB) is shown to the right. (C) Identification of  $\alpha$ -importin isoforms associated to PB2. The proteins eluted with TEV protease from the IgG-Sepharose column were analysed by Western-blot with antibodies specific for various forms of  $\alpha$ -importin. The antibodies used are indicated to the left whereas the position of the Western-blot signals is shown to the right. (D) Composition of polymerase subunits PB2-associated proteins. Complexes containing PB2 were purified from PB2-TAP- (PB2-TAP) or PB2-transfected cells (PB2), using the TAP approach. Aliquots of the samples after two affinity chromatography steps were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. The position of molecular weight markers is indicated to the left. Only the relevant sections of the gel are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0003904.g001

encoding each of the polymerase subunits, the NP and the recombinant replicon. Either wt or mutant PB2-encoding plasmids were used, while PB2 plasmid was omitted as a negative control.



**Figure 2. Phenotype of PB2 mutants with altered NLS.** (A) Sequence of the PB2 NLS located close to the C-terminus. The position of the two regions of the bipartite NLS (NLS-1 and NLS-2) is indicated, as well as the mutations present in mutants 737, 738, KNRQ, 8/K and ΔNLS. (B) Representative intracellular localisations of wt and mutant PB2 proteins. Central optical sections are presented of HeLa cells mock-transfected (MOCK), transfected with wt PB2 (WT) or with each of the mutant PB2 proteins. Nuclei were stained with DAPI (blue) and PB2 was stained with anti-PB2 monoclonal antibody and goat anti-mouse IgG coupled with Alexa 488 (green). (C) Quantitative estimation of the localisation of wt or mutant PB2 proteins. Around 100 individual cells were scored as: N, exclusively nuclear; N>C, nuclei more stained than the cytoplasm; NC, equal nuclear and cytoplasmic staining or C, exclusively cytoplasmic staining. (D) Biological activity of recombinant

RNPs with mutated PB2 proteins. Cultures of HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing PB1, PA, NP and either wt or mutant PB2, as well as a plasmid encoding CAT gene in negative polarity, flanked by the non-translated regions of influenza NS segment. Plasmid expressing PB2 was omitted as a negative control. At 20 hours post-transfection total cell extracts were prepared and CAT protein was determined by ELISA. The averages and standard deviations of 3–9 independent experiments are shown.

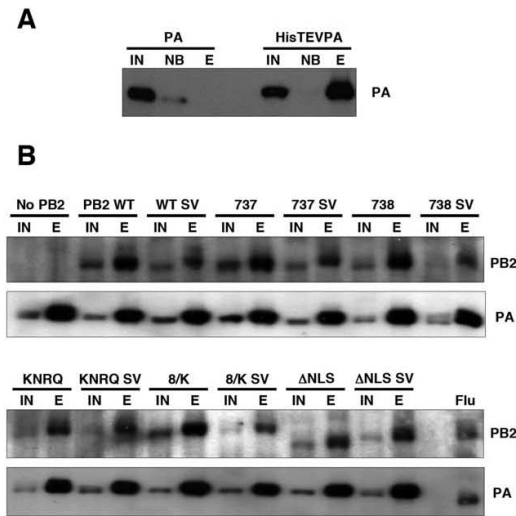
doi:10.1371/journal.pone.0003904.g002

The CAT protein accumulation was used as a measure of the combined replication-transcription activity of each recombinant RNP. The results obtained are presented in Fig. 2D and show that the NLS mutations in PB2 lead to a much stronger phenotype than that expected from the intracellular localisation of the protein. Thus, mutants 737 and 738, which show a localisation hardly distinguishable from wt PB2 (Fig. 2B), led to RNPs 2–4 times less active than wt RNPs. On the other hand, mutants KNRQ and 8/K, which still show considerable accumulation of PB2 in the nucleus (Fig. 2B), gave rise to RNPs 10–100 times less active than wt. In addition, mutant ΔNLS, which was not completely excluded from the nucleus, was completely inactive. These results indicated that there is a correlation between the progressive reduction in mutant PB2 domain interaction with importin alpha [10] and a decrease in the activity of the mutant RNPs. However, the much stronger activity phenotype suggested that the defect in PB2 intracellular localisation is not the only cause for the reduction in mutant RNP activity and led us to test other alternatives. A naive explanation would be that the polymerase complex is not formed. Hence, we tested this possibility by cotransfection of plasmids expressing PB1, His-TEVPA and either wt or mutant PB2, and pull-down with Ni-NTA-agarose. Complex formation was ascertained by Western-blot with anti-PB2 antibodies and is shown in Fig. 3. No significant differences were observed in the capacity of mutant or wt PB2 proteins to produce polymerase complexes.

Insertion of an ectopic NLS does not rescue the activity of RNPs generated with NLS PB2 mutants

To distinguish whether the interaction of α-importins to the C-terminal NLS of PB2 is only important for its nuclear accumulation or it rather plays additional roles in the activity of the virus RNPs we tried to rescue the nuclear localisation of the PB2 mutants by the ectopic insertion of an alternative NLS. Thus, a SV40 TAg NLS was inserted at the C-terminus of either wt or each of the most affected PB2 mutants, KNRQ, 8/K and ΔNLS (see Fig. 4A for a diagram), and the localisations of the chimeric proteins were tested by indirect immunofluorescence of transfected cells. As expected, nuclear localisation was maintained in the wt protein and was rescued for the KNRQ and 8/K mutant proteins containing a TAg NLS (Fig. 4B, C). As rescue of ΔNLS mutant was not complete, its phenotype was not analysed further. After verification that the TAg NLS-containing PB2 proteins formed heterotrimeric polymerase complexes efficiently (Fig. 3), we tested the intracellular localisation of wt or mutant PB2 proteins in cells co-expressing the other subunits of the polymerase. Cultures of HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing PB1, PA and either wt or the mutant PB2 proteins with stronger phenotypes (KNRQ SV or 8/K SV). As it has been shown that nuclear transport of PB1-PA and PB2 proteins are independent [11,13], the cells were analysed by immunofluorescence by double-staining with antibodies specific for PB1 and PB2. Representative images are presented in Fig. 5 and the quantitation of the data appears in Fig. 6A. These results show that both wt and





**Figure 3. Polymerase complex formation of wt and mutant PB2 proteins.** Cultures of HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing PB1, HisTEVPA or PA as a control, and either wt or mutant PB2. PB2 was omitted as a control. Total cell extracts were prepared and analysed by pull-down with  $^{32}$ Pi-NTP-agarose and Western-blot using anti-PB2 and anti-PA monoclonal antibodies. (A). Controls for the pull-down experiment. (B). Analysis of PB2 mutants. IN: Input extract. NB: Not bound to the resin. E: Eluted fractions. SV denotes that an additional NLS derived from SV40 TAg has been inserted. An extract obtained from influenza virus-infected cells was used as mobility marker (Flu). doi:10.1371/journal.pone.0003904.g003

mutant PB2 proteins containing a TAg NLS are localised to the nucleus in cells positive for PB1 staining. Therefore, neither the NLS point mutations nor the insertion of the TAg NLS altered significantly the folding of PB2, as it could correctly form polymerase complex (Fig. 3) and be transported to the nucleus (Figs 5 and 6A).

The activity of each of these rescued mutant RNPs was again tested in the CAT minireplicon assay as described above and the results are presented in Fig. 6B. The insertion of a TAg NLS downstream of wt PB2 led to a 2–3-fold decrease in the accumulation of CAT protein and similar reductions were observed for the KNRQ and 8/K mutants (Fig. 6B). No rescue of CAT expression was observed for RNPs with KNRQ or 8/K mutations in PB2 by insertion of an additional NLS, in spite of an almost complete nuclear localisation of the mutant PB2 proteins. Therefore, we can conclude that the lack of nuclear localisation of PB2 mutants is not the main cause for the lack of RNP activity. Rather, the NLS mutations must affect a step downstream in the infection cycle, probably during RNA replication or transcription.

#### Mutation of the PB2 NLS affects viral RNA replication

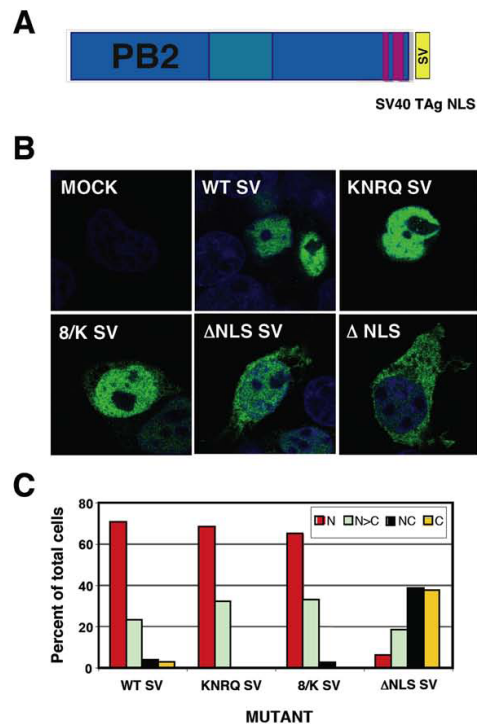
To determine which step in viral replication requires the interaction of virus polymerase with importin  $\alpha$ , we reconstituted *in vivo* RNPs using as replicon a 248 nt long negative polarity RNA derived from viral RNA 8 [18]. Such RNPs accumulate efficiently *in vivo* and can be purified biochemically [4,5]. The cell cultures were transfected with plasmids expressing PA, NP and

either wt or mutant PB2 proteins containing an additional TAg NLS. To allow RNP purification, a TAP-tagged PB1 protein was coexpressed [5,16]; alternatively, untagged PB1 was used as a control. In this way, the progeny RNPs produced *in vivo* could be bound to IgG-Sepharose and eluted specifically by digestion with TEV protease [16]. In this assay, the amount of purified recombinant RNPs is a measure of their replication *in vivo*, as any polymerase null mutation abolishes the generation of RNPs [19,20]. The accumulation of viral RNPs was measured by Western-blot with antibodies specific for NP. The results are presented in Fig. 7A, B and show clearly that the accumulation of RNPs *in vivo* was almost abolished when the KNRQ or 8/K mutations were introduced in PB2 protein. These results were confirmed by determination of the transcriptional activity of the purified RNPs. The average and standard deviation of three independent purification experiments are presented in Fig. 7C, again showing that essentially no *in vivo* accumulation of RNPs occurred when mutations KNRQ or 8/K were introduced in PB2.

#### Strain-dependent interaction of human $\alpha$ -importins to the PB2 subunits of influenza viruses

The PB2 protein is one of the most relevant viral determinants for avian virus adaptation to human cells [21,22] and adaptation of an avian virus to mice involves alteration of PB2 interaction with  $\alpha$ -importins [17]. These facts, together with the importance of the interaction of PB2 with  $\alpha$ -importins for viral replication prompted us to test whether PB2 proteins derived from viruses of





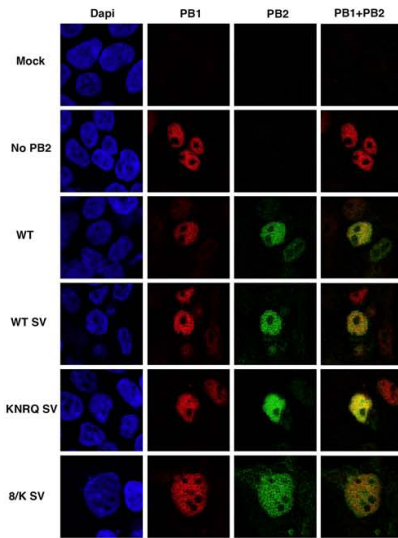
**Figure 4. Intracellular localisation of mutated PB2 proteins containing an ectopic NLS.** (A) Diagram showing the structure of PB2 protein containing a SV40 Tag NLS at its C-terminus. (B) Representative phenotypes of the intracellular localisation of wt and mutant PB2 proteins. Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing either wt or mutant PB2 proteins containing an additional NLS signal at the protein C-terminus. Central optical sections are presented of mock-transfected (MOCK), transfected with wt PB2 (WT) or with each of the mutant PB2 proteins. The phenotype of the ΔNLS mutant lacking the SV40 Tag NLS is also shown. Nuclei were stained with DAPI (blue) and PB2 was stained with anti-PB2 monoclonal antibody and goat anti-mouse IgG coupled with Alexa 488 (green) (C) Quantitative estimation of the localisation of wt or mutant PB2 proteins was performed as indicated in Fig. 2C. doi:10.1371/journal.pone.0003904.g004

different phylogenetic origins would show differential capacities for an stable association to human  $\alpha$ -importins. Thus, the PB2 coding regions of A/Goose/Guangdong/1/97 (H5N1), an avian strain, and those from A/Vietnam/1203/04 (H5N1) and A/Thailand/Kan1/04 (H5N1), two viruses isolated from sporadic avian influenza cases in humans, were TAP-tagged, expressed in human cells and used to pull-down  $\alpha$ -importins. As a positive control, A/Victoria/3/75 (H3N2) PB2 was used, as described in Fig. 1C, whereas untagged PB2 was employed as a negative control. The results are presented in Fig. 8. A much reduced association was observed for PB2 proteins of avian H5N1 viruses, both isolated from avian species or from sporadic cases in man. In addition, the interaction is clearly dependent on the  $\alpha$ -importin isoform. Thus,  $\alpha$ 5-importin and  $\alpha$ 7-importin interaction to PB2 from H5N1

viruses was negligible, whereas association of  $\alpha$ 1-importin was only partly diminished as compared with the signal for the PB2 from a human H3N2 virus. These results indicate that the stable interaction of PB2 with  $\alpha$ -importins is host-dependent. Furthermore, the reduced co-purification of  $\alpha$ -importins, particularly  $\alpha$ 5- and  $\alpha$ 7-importins, with PB2 proteins from H5N1 viruses correlate with their reduced replication capacity in human cells [23], suggesting that this interaction might play a role in the adaptation of avian H5N1 viruses to replication in the human host.

## Discussion

The PB2 subunit of the influenza polymerase is an essential element for virus RNA transcription and replication [20,24,25]



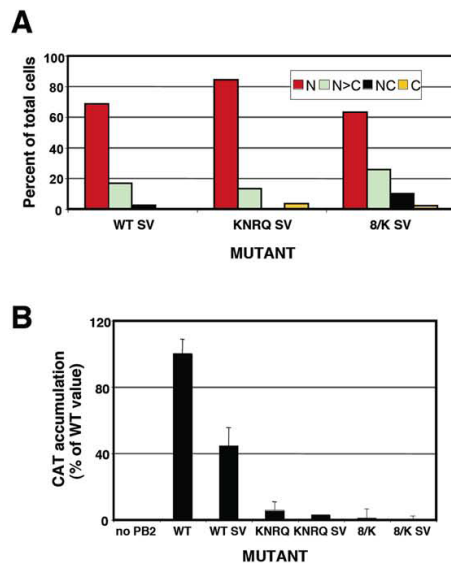
**Figure 5. Intracellular localisation of wt and mutant PB2 proteins in cells co-expressing the polymerase subunits.** Cultures of HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing PB1, PA and either wt or mutant PB2 containing an additional Tag NLS. The cultures were fixed and analysed by double immunofluorescence using antibodies specific for PB1 and PB2 proteins. The signals for nuclear staining (DAPI—blue), PB1 protein (PB1—red), PB2 protein (PB2—green) and the merge of PB1 and PB2 signals are shown for mock-transfected cells (Mock), cells expressing PB1 and PA (No PB2), cells expressing wt polymerase (WT), cells expressing polymerase with PB2-SV protein (WT SV) or cells expressing mutant polymerase containing each of the PB2 mutants with additional Tag NLS (KNRQ SV and 8/K SV). doi:10.1371/journal.pone.0003904.g005

and, in addition, it has been described as a relevant viral gene in the definition of host-range [21–23,26–28]. Hence we set out to purify intracellular complexes containing PB2 protein using the TAP purification approach [29], as performed for the polymerase complex [16]. It was not surprising to identify  $\alpha$ -importin among the proteins associated to PB2 (Fig. 1), since a NLS has been identified at its C-terminus [7] and a PB2 C-terminal domain could be co-crystallised with  $\alpha$ -importin [10]. However, the stability of the interaction *in vivo* was unexpected (Fig. 1D) and hence the relevance of the PB2 interaction to  $\alpha$ -importins for influenza virus infection was analysed by mutation. In agreement with previous data reported for NLS domain- $\alpha$ -importin interaction, mutation of the NLS resulted in defective nuclear import of mutant PB2 proteins, although none of the mutations led to exclusion of the protein from the nucleus (Fig. 2B) and their capacity to form polymerase complexes *in vivo* was not altered (Fig. 3). In spite of proper formation of polymerase complexes, the activity of RNPs including NLS mutations in PB2 was progressively reduced, in parallel to the decrease in their ability to interact with  $\alpha$ -importin [10], as reflected in the activity of a CAT replicon *in vivo* (Fig. 2D). Altogether, the results obtained suggested that

the interaction of  $\alpha$ -importins with the C-terminal NLS in PB2 might serve an additional role, distinct from its normal function for nuclear import, during influenza virus infection. A usual approach to test the relevance of a host factor in a virus infection is to down-regulate its expression by gene silencing and analyse the consequences for the replication of the virus. Such an approach would not be useful here, as down-regulation of  $\alpha$ -importins would reduce nuclear accumulation of PB2 (and other cellular and viral proteins) and hence lead to indirect, non-informative phenotypes. As an alternative, we rescued the nuclear localisation of NLS PB2 mutants by insertion of an additional NLS derived from SV40 TAg (Figs. 4, 5) and asked whether the rescued mutants would lead to the recovery of the biological activity of the RNPs *in vivo*. The results showed clearly that this was not the case (Fig. 6B), indicating that indirectly driven nuclear localisation is not sufficient for RNP activity and suggesting that correct binding of  $\alpha$ -importin to the *bona-fide* PB2 NLS is required. The correlation between (i) the import phenotype of the various mutants generated, (ii) their ability to interact *in vitro* with  $\alpha$ -importin [10] and (iii) the reduced activity of the mutant-containing RNPs, makes it very unlikely that the functional defect described here is unrelated to the alterations in PB2- $\alpha$ -importin interaction. It could be argued that insertion of the SV40 TAg NLS itself impairs the activity of the RNPs but this is also unlikely since (i) it only diminishes the activity of wt RNPs by twofold (Fig. 6B) and (ii) insertion of any tags at PB2 C-terminus (His, TAP, GFP) did not alter the activity of RNPs [5,11].

As PB2 protein is involved in the cap-RNA recognition required for cap-snatching, it might be hypothesized that interaction with  $\alpha$ -importin is important for viral transcription initiation. However, purified viral RNPs, either derived from virions or isolated from a recombinant system, are capable of efficient *in vitro* transcription using capped mRNA as a cap donor [5] (R. Coloma, unpublished results), suggesting that  $\alpha$ -importin is not an essential cofactor for viral transcription. Indeed, the experiments reported here revealed that alteration of PB2 NLS abolishes virus RNP accumulation *in vivo* (Fig. 7). These results are consistent with the transient accumulation of  $\alpha$ -importin in the nucleus of infected cells [17] and are easier interpreted by proposing that  $\alpha$ -importin acts as a cofactor for virus RNA replication, although we can not exclude that it also plays a role during transcription of progeny RNPs. At least two alternative models can be put forward to explain the requirement of  $\alpha$ -importin: either *bona-fide* interaction of PB2 with  $\alpha$ -importin is necessary for the proper folding of an active viral polymerase complex or it is needed for RNP replication itself. Further experimentation will be required to distinguish between both possibilities.

Our results should also be put in the perspective of the adaptation of avian influenza viruses to mammalian hosts, in particular to man. As indicated above, the PB2 gene is a major player in the ability of avian polymerase complexes to replicate in mammalian hosts [21–23,27,28] (reviewed in [30]). A series of mutation signatures in PB2 have been identified that accompany avian virus adaptation [26], some of which are located close to the NLS-containing domain in the primary sequence (for example A674T, K702R) (Fig. 8B). Other host-range mutations lay far apart in the sequence of PB2 [26] but it is possible that some of them are spatially close to the  $\alpha$ -importin binding site and might alter the interaction with  $\alpha$ -importin, as suggested from the co-crystal structure determined recently [10]. Moreover, it has been recently shown that mutation D701N stimulates binding of PB2 to  $\alpha$ -importin in human but not in avian cells [17]. The differential interaction of PB2 proteins derived from viruses of avian and human origin with human  $\alpha$ -importins (Fig. 8A), is spite of having



**Figure 6. Biological activity of recombinant RNPs with an ectopic NLS in PB2 protein.** (A) Quantitative estimation of the localisation of wt or mutant PB2 proteins was performed as indicated in Fig. 2C. (B) Cultures of HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing PB1, PA, NP and either wt or mutant PB2, with or without an additional TAG NLS fused to the C-terminus of the protein. In addition, a plasmid encoding CAT gene in negative polarity, flanked by the non-translated regions of influenza NS segment was co-transfected to provide a viral replicon. Plasmid expressing PB2 was omitted as a negative control. At 20 hours post-transfection total cell extracts were prepared and CAT protein was determined by ELISA. The averages and standard deviations of 3–9 independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pone.0003904.g006

no differences in the C-terminal NLS, suggests that other regions in the protein might be responsible for the stable association observed. This would be in agreement with the observation that, even in mutant 8/K which contains three mutations affecting both sections of the C-terminal NLS, partial nuclear localisation is detected (Fig. 2B,C). In this context it is worth mentioning that the original description of the PB2 NLS [7] identified an internal region (aa 449–495) whose deletion led to incomplete nuclear targeting of PB2. Although this could be interpreted as result of protein misfolding, it could also reflect the possible relevance of amino acid at position 475. This is one of the most tightly host-linked mutations [26] and is leucine in avian viruses and methionine in human strains (Fig. 8B). As a whole, our results are in agreement with the previous proposal that nuclear transport of the viral polymerase might be a host-dependent step [17] and further extend the implications of host-dependent PB2 interaction with  $\alpha$ -importin by showing that such interaction is stable and important for virus RNA replication itself.

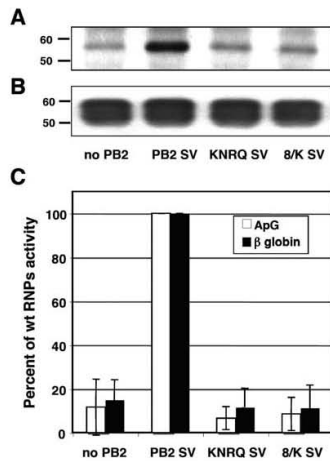
## Materials and Methods

### Biological materials

The HEK 293T cell line was obtained from J.C. de la Torre and the HeLa cell line was acquired from ATCC. They were

cultivated as described [31]. The vaccinia virus vTF7-3 [32] was a gift of B. Moss. Plasmids pGPB1, pGPB2, pGPA and pGNP have been described [19]. Plasmids pGPB1TAP and pGPB2TAP, with the TAP tag [29] fused to the C-terminus of either PB1 or PB2 were described previously [33]. The ORFs of PB1, PB2 and PA were transferred from the pG plasmid series [19] to pCDNA3.1 to generate plasmids pGPB1, pGPB2 and pGPA. Plasmid pCHis-TEVPA was constructed by insertion of a 6xHis tag and the TEV cleavage site at the N-terminus of PA (sequences available on request). The PB2 SV mutant series was generated by insertion of a SV40 TAg NLS sequence at the C-terminus of the protein (sequences available on request). Plasmid pCMVNP has been described [34]. The inserts of plasmids pT7NSCAT-RT and pT7ANSClone23 [18] were transferred to pHH21 [35] to generate plasmids pHHNSCAT and pHHclone23. Plasmids containing the cDNAs of PB2 from A/Goose/Guangdong/1/97 (H5N1), A/Thailand/Kan1/04 (H5N1) and A/Vietnam/1203/04 (H5N1) were obtained from S. Pleschka, G. Gabriel and R. Donis, respectively. Their ORFs were transferred to pGPB2TAP to generate plasmids pGPB2GuaTAP, pGPB2ThTAP and pGPB2VnTAP, respectively.

Anti-PB1 serum and anti-PB2 monoclonal antibodies have been described [18,36,37]. Rabbit antisera specific for NP was generated by immunisation with purified His-NP. Antibodies

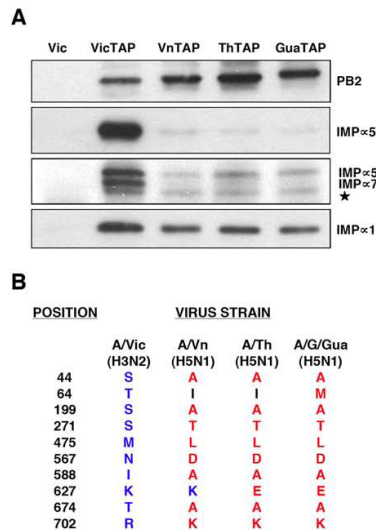


**Figure 7. Replication capacity of recombinant RNPs with an ectopic NLS in PB2 protein.** HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing either PB1-TAP or PB1, PA, NP and either wt or mutant PB2 containing an additional TAG NLS, as well as a plasmid encoding a viral replicon containing 248 nt [5]. Twenty four hours after transfection, extracts were prepared and progeny RNPs were purified by affinity chromatography on IgG-Sepharose and cleavage with TEV protease. (A) Accumulation of purified RNPs as determined by Western-blot using anti-NP specific antibodies. (B) Total NP present in the cell extracts before purification. (C) Accumulation of purified RNPs as determined by transcription in vitro using ApG (white bars) of β-globin (black bars) as primers. The data presented are the averages and standard deviations from three independent purification experiments. doi:10.1371/journal.pone.0003904.g007

specific for α5-importin, α1-importin and α5/α7-importin were purchased to Abnova, BD Biosciences and Sigma, respectively.

#### Biochemical analyses

To purify PB2 associated proteins, HEK293T cells were infected with vIF7-3 virus at a moi of 10 pfu/cell and transfected with plasmid pGPB2TAP, or pGPB2 as a control, using the calcium phosphate transfection protocol [38]. After 16–20 h incubation at 37°C, extracts were prepared and the PB2-containing complexes were purified by the TAP approach [33]. Western-blotting and silver-staining were carried out as described [33,39]. For immunofluorescence, HeLa cells were transfected with pGPB2 plasmid or mutants thereof using Eugene HD reagent (GE Healthcare) as recommended by the manufacturer and fixed with 3.7% formaldehyde at 20 hours post-transfection. HEK293T cells were transfected with PB2 alone or with the three subunits of the polymerase as indicated above. At 16 hours post-transfection they were seeded on coverslips and fixed 16 hours thereafter. The cells were permeabilised with 0.5% Triton ×100 and processed for indirect immunofluorescence with anti-PB2 monoclonal or anti-PB1 polyclonal antibodies as described before [40]. Images were collected on a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) and analyzed with the LAS AF Software (Leica Microsystems).



**Figure 8. Association of human α-importin isoforms to PB2 protein from various viral strains.** The PB2 proteins from either A/Victoria/3/75 (VicTAP), A/Vietnam/1203/04 (VnTAP), A/Thailand/Kan1/04 (ThTAP) or A/Goose/Guangdong/1/97 (GuaTAP) strains were TAP-tagged and expressed by transfection into human HEK293T cells. Untagged PB2 from A/Victoria/3/75 (Vic) virus was used as a control. The PB2 protein was purified by binding to IgG-Sepharose and elution with TEV protease. (A) Analysis of the eluates by Western-blot using antisera specific for α-importins α1, α5 and α5/α7, as well as anti-PB2. The position of the specific bands is indicated to the right. The star denotes a cross-reaction band of unknown origin. (B) Comparison of the PB2 sequences of the virus strains used, at the positions identified as linked to host-range [26]. No differences were observed among these PB2 proteins at the C-terminal NLS. doi:10.1371/journal.pone.0003904.g008

#### Polymerase and RNP activity

To assay polymerase complex formation, HEK293T cell cultures were co-transfected with plasmids pCPB1, pCPB2 (or mutants thereof) and pCHisTEVPA. Total cell extracts were analysed by <sup>32</sup>Ni-NTA-agarose chromatography as described [5] and Western-blot using anti-PB2 antibodies. To determine the RNP biological activity (transcription plus replication), HEK293T cells were co-transfected with plasmids pCPB1, pCPB2 (or mutants thereof), pGPA, pGMVNP and pHHNSCAT as indicated. At 20 h post-transfection, total cell extracts were prepared and CAT protein was determined by ELISA (GE Healthcare). The replication of recombinant RNPs was determined as follows: HEK293T cells were infected with vaccinia vTF7-3 and transfected with plasmids pGPB1TAP or pGPB1, pGPA, pGNP, pT7ΔNS-RT clone 23 and either pCPB2 or mutants thereof [4,18]. At 24 hours post-transfection, extracts were prepared and the RNPs amplified in vivo were purified by binding to IgG-Sepharose and cleavage with TEV protease [33]. The accumulation of progenic RNPs was determined by Western-blot using



anti-NP sera. The activity of the purified RNPs was tested by ApG- and  $\beta$ -globin mRNA-driven *in vitro* transcription [5,41].

#### Proteomic techniques

PB2 associated proteins were separated by PAGE and stained with PAGE-blue™ (Fermentas). Proteins of interest were excised manually and processed as described [16]. The resulting tryptic peptides were prepared using a standard dried droplet technique [42] by overlaying the sample and matrix solutions, spotting an aliquot of 0.8  $\mu$ l of eluted peptides onto a 384-well Opti-TOF™ plate (Applied Biosystems, Framingham, MA) and air drying the samples. The same volume of matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid in 30% acetonitrile-15% isopropanol-0.5% TFA) was deposited.

Peptide mass fingerprinting for each protein, and subsequent MS/MS analysis, were obtained automatically in a 4800 MALDI-TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA), first calibrated externally. For acquisition and peak lists generation of each spectrum, the 4000 Series Explorer software v3.5.28193 (Applied Biosystems) was used. For protein identification, the combined peptide mass fingerprint and MS/MS data search was performed using GPS Explorer™ software v3.6 (Applied Biosystems) against the NCBI nr database using MASCOT 2.1 software (Matrix Science, London, UK). Search parameters were: carbamidomethyl cysteine as fixed modification by the treatment with iodoacetamide, oxidized methionines as variable modification and 1 missed cleavage site allowed. Peptide and fragment mass tolerance were set to 100 ppm and  $\pm 0.8$  Da, respectively. In all protein identifications, the probability protein and peptide mouse scores were greater than the minimum score fixed as significant.

#### Supporting Information

**Figure S1** Expression of wt and mutant PB2 proteins. Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing wt PB2 (WT), mutant PB2, with and without added TAg NLS at their

C-terminus, or mock-transfected (No PB2). Total cell extracts were prepared and analysed by Western-blot using monoclonal antibodies specific for PB2. An extract obtained from influenza virus-infected cells was used as mobility marker (Flu).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003904.s001 (1.66 MB TIF)

**Figure S2** Intracellular localisation of wt and mutant PB2 proteins. Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing wt PB2, mutant PB2 or mock-transfected. The localisation of PB2 was analysed by immunofluorescence using monoclonal antibodies specific for PB2. Central optical sections are presented of HEK293T cells either mock-transfected (MOCK), transfected with wt PB2 (WT) or with each of the mutant PB2 proteins indicated. Nuclei were stained with DAPI (blue) and PB2 was stained with anti-PB2 monoclonal antibody and goat anti-mouse IgG coupled with Alexa 488 (green).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003904.s002 (5.40 MB TIF)

**Table S1** Summary of proteomic identifications.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003904.s003 (0.03 MB DOC)

**Table S2** Complete data for the proteomic analysis.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003904.s004 (0.13 MB DOC)

#### Acknowledgments

We thank J.C. de la Torre, G. Gabriel, S. Pleschka, R. Donis and B. Moss for providing biological materials and D. Hart for sharing with us data prior to publication. The technical assistance of Sylvia Gutiérrez-Erlandsson, José M. Coll Marqués and Jacinta Fernández is gratefully acknowledged.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PRI NJ JO. Performed the experiments: PRI NJ NZ YF SJ. Analyzed the data: PRI NJ NZ YF SJ JO. Wrote the paper: PRI NJ SJ JO.

#### References

- Elton D, Digard P, Tiley L, Ortin J (2005) Structure and function of the influenza virus RNP. In: Kawaoka Y, ed. Current Topics in Influenza Virology. Norfolk: Horizon Scientific Press, pp 1–92.
- Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 121–143.
- Palese P, Shaw M (2006) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology* 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 1647–1689.
- Martín-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, et al. (2001) Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports* 2: 313–317.
- Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, et al. (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 308–313.
- Torreira E, Schöen G, Fernández Y, Jorba N, Ruigrok RW, et al. (2007) Three-dimensional model for the isolated influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 35: 3774–3783.
- Mukaiyama J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* 65: 245–253.
- Nath ST, Nayak DP (1990) Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1N1). *Mol Cell Biol* 10: 4139–4145.
- Nieto A, de la Luna S, Bárcena J, Porcila A, Ortin J (1994) Complex structure of the nuclear translocation signal of the influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol* 75: 29–36.
- Tarendeau F, Boudet J, Guillemy D, Mas PJ, Bougault CM, et al. (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 14: 229–233.
- Fodor E, Smith M (2004) The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* 78: 9144–9153.
- Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitzhev AV, Brownlee GG, et al. (2006) The role of Ran Binding Protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* 80: 11911–11919.
- Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee GG (2005) *In vitro* assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* 79: 8669–8674.
- Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, et al. (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277: 45306–45314.
- Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K (2007) Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* 81: 1339–1349.
- Jorba N, Juárez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamarreño N, et al. (2008) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8: 2077–2088.
- Gabriel G, Herwig A, Klenk HD (2008) Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin  $\alpha$ 1 is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* 4: e11.
- Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrasosa JL, et al. (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 74: 156–163.
- Ména I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, et al. (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* 75: 2109–2114.
- Perales B, Ortin J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* 71: 1381–1385.
- Almond JW (1977) A single gene determines the host range of influenza virus. *Nature* 270: 617–618.
- Subbarao EK, London W, Murphy BR (1993) A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67: 1761–1764.
- Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welch MA, van der Werf S, Naffakh N (2007) Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* 362: 271–282.

24. Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* 76: 5096–5108.
25. Lee MT, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, et al. (2002) Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 30: 429–438.
26. Finkelstein DB, Mukaitira S, Mutha PK, Obenauer JC, Su X, et al. (2007) Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses. *J Virol* 81: 10292–10299.
27. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, et al. (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18590–18595.
28. Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, et al. (2005) Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* 79: 12058–12064.
29. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, et al. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17: 1030–1032.
30. Nafikh N, Tomou A, Rameis-Weil MA, van der Werf S (2008) Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Ann Rev Microbiology* 62: 403–424.
31. Ortín J, Nájera R, López C, Dávila M, Domingo E (1980) Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* 11: 319–331.
32. Fuerst TR, Earl PL, Moss B (1987) Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol Cell Biol* 7: 2538–2544.
33. Jorba N, Arca E, Ortín J (2008) Oligomerisation of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol* 89: 520–524.
34. Falcón AM, Marión RM, Zürcher T, Gómez P, Portela A, et al. (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J Virol* 78: 3880–3888.
35. Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, et al. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9345–9350.
36. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, et al. (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* 68: 6900–6909.
37. Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, et al. (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* 37: 305–315.
38. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, et al. (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1373–1376.
39. Marión RM, Zürcher T, de la Luna S, Ortín J (1997) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* 78: 2447–2451.
40. Villacé P, Marión RM, Ortín J (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32: 2411–2420.
41. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infiante P, Goloma R, Crepin T, et al. (2008) The structural basis for cap-binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 500–506.
42. Zhang J, Zenobi R (2004) Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39: 808–816.

## **Genetic *trans*-Complementation Establishes a New Model for Influenza Virus RNA Transcription and Replication**

Núria Jorba, Rocío Coloma and Juan Ortín\*

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) and CIBER de Enfermedades Respiratorias. Darwin 3, Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid, Spain.

\*Corresponding author:

Email: jortin@cnb.csic.es

Accepted in Plos Pathogens

## Abstract

The influenza A viruses genome comprises 8 single-stranded RNA segments of negative polarity. Each one is included into a ribonucleoprotein particle (vRNP) containing the polymerase complex and a number of nucleoprotein (NP) monomers. Viral RNA replication proceeds by formation of a complementary RNP of positive polarity (cRNP) that serves as intermediate to generate many progeny vRNPs. Transcription initiation takes place by a cap-snatching mechanism whereby the polymerase steals a cellular capped oligonucleotide and uses it as primer to copy the vRNP template. Transcription termination occurs prematurely at the polyadenylation signal, that the polymerase copies repeatedly to generate a 3'-terminal polyA. Here we studied the mechanisms of the viral RNA replication and transcription. We used efficient systems for recombinant RNP transcription/replication *in vivo* and well defined polymerase mutants deficient in either RNA replication or transcription to address the roles of the polymerase complex present in the template RNP and newly synthesised polymerase complexes during replication and transcription. The results of trans-complementation experiments showed that soluble polymerase complexes can synthesise progeny RNA *in trans* and become incorporated into progeny vRNPs, but only transcription *in cis* could be detected. These results are compatible with a new model for virus RNA replication, whereby a template RNP would be replicated *in trans* by a soluble polymerase complex and a polymerase complex distinct from the replicative enzyme would direct the encapsidation of progeny vRNA. In contrast, transcription of the vRNP would occur *in cis* and the resident polymerase complex would be responsible for mRNA synthesis and polyadenylation.

## Author summary

The influenza A viruses produce annual epidemics and occasional pandemics of respiratory disease. There is great concern of a potential new pandemic being caused by presently circulating avian influenza viruses and hence increasing interest in understanding how the virus replicates its genome. This comprises eight molecules of RNA, each one bound to a polymerase complex and encapsidated by multiple copies of the nucleoprotein, in the form of ribonucleoprotein complexes (RNPs). These structures are responsible for virus RNA replication and transcription but the detailed mechanisms of these processes are not fully understood. We report here the results of genetic complementation experiments using proficient *in vitro* and *in vivo* recombinant systems for transcription and replication, and polymerase point mutants that are either transcription-defective or replication-defective. These results are compatible with a new model for virus replication whereby a polymerase distinct from that present in the parental RNP is responsible for RNA replication *in trans* and the progeny RNP is associated to a polymerase distinct from that performing replication. In contrast, transcription is carried out *in cis* by the polymerase resident in the RNP.

## Introduction

The influenza A viruses are the causative agents of yearly epidemics of respiratory disease and occasionally more severe pandemics [1]. The latter are the consequence of transfers from the avian virus reservoir to humans by either genetic reassortment or direct adaptation [2]. Thus, current occasional infections of humans with highly pathogenic H5N1 avian strains have raised fears about a possible new pandemic of great severity.

The influenza A viruses belong to the family *Orthomyxoviridae* and possess a single-stranded, negative-polarity RNA genome made up by 8 RNA segments, that form ribonucleoprotein (RNP)



complexes by association to the polymerase and the nucleoprotein (NP). Such RNPs are independent molecular machines responsible for transcription and replication of each virus gene and contain an RNA-dependent RNA polymerase composed by the PB1, PB2 and PA subunits [3]. The polymerase complex recognises the RNA promoter comprising both 5'-terminal and 3'-terminal sequences of each segment, by preferentially binding the 5'-terminal end [4-6], and in this way stabilises a supercoiled conformation of the RNPs [7].

Upon infection of susceptible cells, the parental RNPs are first transcribed in the nucleus (primary transcription). Transcription initiation takes place by a cap-snatching process whereby the viral polymerase recognises the cap structure of cellular pre-mRNAs in the nucleus, cleaves these some 15 nt downstream the cap and utilises such capped-oligonucleotides as primers to copy the virus template RNA [8]. Transcription finalises by reiterative copy of the virus polyadenylation signal, an oligo-U sequence located close to the 5'-end of the template [9,10]. Synthesis of new virus proteins is required to proceed to RNP replication [11], that takes place first by the generation of complementary RNPs (cRNPs). These RNPs are structurally analogous to those present in the virions (vRNPs) but contain complete positive-polarity copies of the virus RNA segments, that are neither capped nor polyadenylated. The structural differences between the vRNP transcription and replication products (mRNAs and cRNPs) led to the proposal of a transcription-to-replication switch by which the parental RNPs would change from capped-RNA-dependent to *de novo* initiation, from polyadenylation to full copy of the template, and in addition would induce encapsidation of the RNA product into new RNPs (reviewed in [12]. Such notion has been challenged recently by a new model proposing that parental vRNPs can directly synthesise cRNA but require newly synthesised polymerase and NP to stabilise the product in the form of cRNPs [13]. The cRNPs accumulate to low levels but serve as efficient templates for the synthesis of large quantities of progeny vRNPs that can be transcribed (secondary transcription) and eventually be incorporated into progeny virions [3].

Much information has been obtained during recent years on structural aspects of the RNPs [14,15] (R. Coloma, unpublished results) and their components, like the NP [16,17], the polymerase complex [18,19] and specific domains of the polymerase subunits [20-24]. Likewise, a number of host cell factors have been identified that may play important roles in the transcription and replication processes [25-34]. However, much remains to be learned about the detailed mechanisms for RNP transcription and replication. For instance, it is not clear whether the polymerase complex present in the template RNP is able to synthesise the progeny vRNA or whether the replicative complex directs the encapsidation of progeny RNA it into a new vRNP. Likewise, it has been assumed that the polymerase complex present in the vRNP accounts for viral mRNA synthesis, but it is not clear whether other vRNPs or other soluble polymerase complexes perform this step *in trans*. In this report we used efficient *in vivo* recombinant replication and transcription systems and defined polymerase mutants specifically affected in either transcription or replication to answer these questions. Our results are consistent with a new model whereby polymerase complexes not associated to the template cRNP are responsible for the replicative synthesis of vRNPs *in trans* and polymerase complexes distinct from the replicative one specify the encapsidation of viral RNAs. On the contrary, no vRNP transcription could be detected by other RNP or a soluble polymerase complex *in trans*, suggesting that it takes place by the activity of the RNP-associated polymerase complex.

## Results

### *The experimental approach*

To gather information on the mechanisms of influenza virus transcription and replication we have adopted a genetic *trans*-complementation approach. This is based on the ability to reconstitute *in vivo* an efficient transcription-replication system that mimic these steps of the infection cycle and is more amenable to experimental manipulations [15,35]. Furthermore, the vRNP products can be efficiently purified, their structural and biological properties can be easily analysed [14,18,20] and they can in turn be used as templates for further rounds of *in vivo* replication. Essential for these approaches is the availability of well-defined mutants to be used as genetic markers. We have earlier described point mutants in the PB2 subunit of the viral polymerase that are defective in viral RNA replication but fully efficient in virus transcription [36]. Likewise, we have recently reported polymerase PB2 mutants that are affected in the cap-binding activity and hence are defective in cap-snatching, but retain their capacity to replicate virus RNPs [20].

### *A polymerase complex distinct from the replicative enzyme becomes associated in trans to the newly synthesised vRNA*

Using the approaches indicated above we first addressed the question whether the replication deficiency of point mutants within the N-terminus of PB2 [36] could be rescued *in trans* by co-expression of PB2 point mutants defective in cap-binding [20]. Cultures of HEK293T cells were co-transfected with plasmids encoding PB1, PA, NP and a deleted NS virus replicon (clone 23, 248 nt in length; [14,15]). In addition, either PB2wt or PB2 mutants R142A or F130A (replication-defective) or mutant E361A (transcription-defective) were co-expressed. Alternatively, pair wise combinations of these PB2 mutants were co-expressed (R142A+E361A and F130A+E361A). Among the PB2 proteins expressed, either wt or the replication-defective mutants R142A or F130A were His-tagged at the C-terminus, a modification that does not alter their biological activity and allows the efficient purification of the *in vivo* RNP replication progeny [18]. The expression levels of all PB2 mutants were shown to be similar to that of PB2wt (Fig. S1) and the untagged PB2wt was used as a control for purification (see diagram of the experimental setting in Fig. 1A). After incubation, the cell extracts were used for Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose purification as described in Materials and Methods and the accumulation of progeny RNPs was determined by means of Western-blot assays using anti-NP sera. The purification of the complete RNPs was verified by Western-blot with antibodies specific for PB2 and PA (Fig. 1B). This strategy allows measuring the replication capacity of the RNPs formed *in vivo*, as omitting any RNP element or using a defective point mutant leads to undetectable RNP accumulation [15,36,37]. Amplification of virus RNPs was expected for wt and mutant polymerase containing transcription-defective PB2 (E361A), but not for those containing replication-defective PB2 (R142A and F130A). However, since no tag is present in the former mutant, only RNPs derived from cultures containing PB2His were expected in the Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose purified material. This was indeed the case, as shown in Fig. 1B. If the transcription-defective polymerase were able to rescue *in trans* the defect in replication of polymerase mutants R142A or F130A, one would expect the accumulation and purification of RNPs containing these mutant PB2. The results obtained by the co-expression of pairs of replication- and transcription-defective polymerases indicate that such prediction is hold (Fig. 1B). The transcription-defective mutant could rescue both R142A and F130A alleles and similar rescue was obtained when other transcription-defective mutants, like H357A, K370A, F404A [20] were used (Fig. S2).

The progeny RNPs contained the replication-defective PB2 allele, since (i) they could be purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose chromatography and (ii) the mobility of the PB2 subunit in the Western-blot assay corresponded to the His-tagged subunit and not to the untagged one. It is important to

mention that only His-tagged PB2 protein was detected in the purified RNPs and not the untagged counterpart, indicating that no transcription-defective polymerase was co-purified (Fig. 1B). Furthermore, the phenotype of the rescued RNPs was tested by determination of their *in vitro* transcription activity (Fig. 2). Since the transcription-defective mutants had alterations in their cap-binding pocket, they show low *in vitro* transcription activity when a mRNA is used as a cap-donor, whereas cap-independent transcription is observed with a general primer as the dinucleotide ApG [20]. The transcription activity profile of rescued RNPs using ApG or b-globin mRNA as primers was identical to that of wt RNPs, as expected, and not to that of mutant E361A, that is unable to use b-globin as primer [20] (Fig. 2 and Fig. S3).

In the experimental approach used, the reconstitution of a RNP from the viral proteins and genomic RNA has to take place first and its subsequent amplification would account for the bulk of RNPs that can be purified from the transfected cells. Since a RNP template with the replication-defective polymerase does not replicate [36], only transcription-deficient polymerase could perform RNP replication. The results obtained (Figs. 1, 2) demonstrate that a polymerase complex distinct from that responsible for RNP replication (replication-defective versus transcription-defective) is incorporated into the progeny vRNP and suggest that a replication-defective polymerase can direct the encapsidation of the progeny vRNA, i.e. can bind the 5'-terminus of newly synthesised vRNA and direct the incorporation of NP monomers into the progeny vRNP. It could be argued that the incorporation of the replication-defective polymerase to the progeny RNP might occur by exchange with replication-competent during purification *in vitro*. Two lines of evidence argue against such possibility: (i) Our transcription experiments verify that the polymerase present in an RNP complex is stably bound (see below) and (ii) The data reported by Wreede et al. [38] suggest that the binding of a polymerase complex to the 5'-terminal sequence of viral RNA can not be competed by a pre-expressed polymerase. In fact, the average rescue efficiency obtained (55+/-18%) (Figs 1, 2) was very high, and is in line with the possibility that both types of soluble polymerase complexes, transcription- and replication-deficient, are incorporated in the progeny viral RNA, around half of which would not be detected because are not His-tagged.

#### *Non-resident polymerase complexes are responsible for the synthesis of vRNA in trans*

The rescue of viral RNPs containing the mutant R142A polymerase complex, as described above, enabled us to purify these RNPs and use them as templates for a second *in vivo* reconstitution experiment in which instead of a template RNA we introduced the rescued and purified R142A mutant RNPs in the system. This strategy ensured that only replication-defective RNPs are used as templates for *in vivo* replication and allowed us to ask whether the resident polymerase complex or a distinct, soluble polymerase is responsible for replication of RNPs *in vivo*. The concentration and biological activity of these purified RNPs was first controlled by Western-blot and *in vitro* transcription. The results are presented in Fig. 3B and show that higher yields were obtained for RNPs containing the E361A mutation in PB2 than those containing the R142A mutation. This was expected, as the latter could only be amplified by trans-complementation (see Fig. 1 above). The transcription phenotype of these purified RNPs was in agreement with the mutations present in PB2 (Fig. 3B, right panel). Therefore, cultures of HEK293T cells were co-transfected with purified RNPs containing either the R142A mutation or the E361A mutation in PB2, plasmids encoding PB1, PA, NP and a plasmid encoding either PB2-His R142A (replication-defective) or PB2-His E361A (transcription-defective) (see Fig. 3A for a diagram of the experimental setting). As controls, the RNPs were co-transfected with empty pCMV vector or the expression plasmids were transfected in the absence of template RNPs. The intracellular accumulation of progeny RNPs was determined by Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose purification, Western-blot and *in vitro* transcription as indicated above and the results are presented in Fig. 3C and Fig. 4. The cultures co-transfected with RNPs E361A and plasmids including PB2 E361A (Fig. 3C; RNP361-Pol361) served as positive

control and, indeed gave rise to the accumulation of RNPs to levels similar to the standard, wt system (see Fig. 1B, HisPB2). No background was observed when template RNPs were transfected (Fig. 3C; RNP142/CMV, RNP361/CMV). A fraction of the NP expressed was retained in the Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose resin (Fig. 3C; Pol142, Pol361) and defined the background level of the purification protocol (but see Fig. 4 below). The co-transfection of RNPs containing mutation PB2 R142A and the same mutant plasmids yielded no increase above background in the level of purified RNPs (Fig. 3C; RNP142/Pol142) but the mixed transfection of RNPs with the mutation PB2 R142A and the expression plasmids with mutation PB2 E361A led to a high level of replication (around 80% of control values)(Fig. 3C; RNP142/Pol361). To verify these results and to determine the polarity of the progeny RNA, similar experiments were carried out and the RNA present in the purified his-RNPs was analysed by hybridisation with positive- and negative-polarity RNA probes comprising the NS sequence. The results reinforced the data obtained by Western-blot and indicated that most of the progeny RNPs are vRNPs (Fig. 4), as previously reported [15]. The accumulation and phenotype of the progeny RNPs was also verified by in vitro transcription using either ApG or b-globin as primers (Fig. 5). The accumulations observed paralleled those shown in Fig. 3 but the background levels from samples Pol142, Pol361 and RNP142-Pol142 were negligible. Much higher activity levels were obtained with ApG primer, indicating that the progeny RNPs contained PB2 with mutation E361A. The results presented in Figs. 3 and 4 indicate that a polymerase complex distinct from that present in the template RNP can perform the replicative synthesis of viral RNA. The high level of replication detected by trans-complementation suggests that virus RNA replication mostly occurs in trans. It could be argued that the mutation R142A in PB2 might destabilise the polymerase-promoter complex, allowing the efficient replacement by a polymerase complex containing the E361A mutation. However, RNPs containing the R142A mutation are as efficient in transcription as wt RNPs, suggesting that they are not affected in promoter recognition.

#### *Transcription of vRNPs takes place in cis and cannot be stimulated by non-resident polymerase complexes in trans*

It is well established that vRNPs can transcribe mRNAs in the absence of any newly synthesised viral proteins (primary transcription) [39,40] and highly purified recombinant RNPs can transcribe in vitro [18](R. Coloma, unpublished results). However, it is not clear whether transcription takes place intramolecularly, i.e. in cis, or a RNP can transcribe another RNP. To test this possibility we reconstituted in vivo two genetically distinct RNPs, one containing a *cat* virus replicon (with the *cat* negative-polarity ORF flanked by the UTRs of the NS segment of influenza virus), the other one being the NS deletion mutant clone 23 [14,15]. Both RNPs contained a His-tagged PB2 subunit to allow purification by affinity chromatography as indicated above but two PB2 alleles were used, either wt or mutant E361A, which is defective in the recognition of the cap structure [20]. Purified RNPs were used either separately or in combination for in vitro transcription with ApG or b-globin as primers and the transcription products were analysed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. The results are presented in Fig. 6. As expected, the purified wt RNPs were active, both when ApG or b-globin were used as primers (Fig. 6A). The RNPs containing the mutation PB2 E361A could transcribe mRNA with ApG as primer, but did so less efficiently when using b-globin mRNA as primer donor (Fig. 6A). These results allowed us to test whether a purified, wt clone 23 RNP could rescue the transcription activity of mutant E361A *cat* RNP in trans, since the mRNA products would be distinguishable by size (720 nt versus 248 nt). The wild-type *cat* RNPs could transcribe efficiently, both when incubated on their own and when mixed with clone 23 RNPs (Fig. 6B, middle panel). The *cat* RNPs containing PB2 E361A only produced background transcription levels and no increase in the amount of *cat* mRNA was observed when wt clone 23 RNP was co-transcribed (Fig. 6B, right panel). Quantisation of the relevant bands indicated that the increase in *cat* transcript in the co-transcription of clone 23 RNP+E361

*cat* RNP versus the transcription of E361 *cat* RNP was less than 3% of the *cat* transcript value obtained by co-transcription of clone 23 RNP+wt *cat* RNP. These results suggest that, at least *in vitro*, no transcription *in trans* among different RNPs takes place.

However, the possibility still persists that a soluble polymerase complex is able to transcribe a vRNP template *in trans*. To analyse this alternative we generated *in vivo* recombinant RNPs containing the negative polarity *cat* virus replicon, purified them by affinity chromatography as indicated above and used them to transfect HEK293T cultures. Alternatively, the cultures were co transfected with the purified *cat*-containing RNPs and plasmids expressing the polymerase subunits (see Fig. 7A for a diagram of the experiment). As no plasmid expressing NP was used, no *in vivo* replication of the RNPs can take place [41,42]. Two RNP versions were used, either wt or transcription-defective (containing PB2 E361A mutant). Three alternative alleles were used to express *in vivo* PB2, generating wt polymerase, transcription-defective E361A or replication-defective R142A polymerase complexes, and various RNP-polymerase combinations were used in co-transfection experiments. In this way the experiment would mimic the situation of primary transcription (transfection of purified RNPs) or secondary transcription (co-transfection of RNPs with plasmids expressing the polymerase complex). At 24 hours post-transfection total cell extracts were prepared and the CAT protein accumulation was determined by ELISA. To ensure that the purified RNPs used for transfection were biologically active, two assays were carried out. First, their transcription activity was determined *in vitro*. As shown in Fig. 7B, there was a good correlation between the concentration of the RNPs, as determined by Western-blot with anti-NP and anti-PA antibodies, and the their capacity to synthesise RNA *in vitro*. Furthermore, the relative activity when using ApG or b-globin mRNA as primers verified that the purified mutant RNPs contained the E361A mutation (Fig. 7B, 361). In addition, the biological activity of the purified 361 RNPs was verified *in vivo*, by their co-transfection with plasmids expressing the polymerase subunits and NP. The results are presented in Fig. S4 and indicate that they can serve as templates for replication and transcription *in vivo*. Expression of the polymerase subunits did not yield any detectable CAT protein, as expected (Fig. 7C, Pol wt), but the transfection of wt purified RNPs lead to clearly measurable CAT accumulation (Fig. 7C, RNP wt) and co-expression of wt RNPs with wt polymerase did not lead to any increase of CAT accumulation (Fig. 7C, Pol wt-RNP wt). As control transfections with CAT-containing cellular extracts indicated that the carry-over of the protein was in the range of  $10^{-3}$  to  $10^{-4}$  (data not shown), the CAT protein generated by transfection of wt purified RNPs should represent primary transcription. In agreement with their transcription-defective phenotype, transfection of purified mutant 361 RNPs produced much less CAT accumulation (Fig. 7C, RNP 361). No significant increase in the level of CAT protein was observed by co-transfection of the RNPs containing the E361A mutation with polymerase-expressing plasmids, neither wt nor mutant polymerase and no correlation was observed between the accumulation of CAT and the phenotype of the polymerase co-expressed (Fig. 7C; compare Pol wt vs Pol 142 vs Pol 361 + RNP 361). These results indicated that, under the experimental conditions used, no *trans*-activation of transcription occurs *in vivo*.

## Discussion

The processes of virus RNA replication and transcription usually require the action of one to several virus-specific proteins, notably the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and various host cell factors (for a review see [43]). To unravel the complex procedures involved, genetic experimental approaches have been particularly useful. For example, genetic data have strongly supported the requirement of RdRp oligomerisation for RNA replication in several virus groups, like poliovirus [44,45], HCV [46,47] and Sendai virus [48,49]. Early studies on the dominance of RNA-synthesis negative ts mutants of VSV suggested that the oligomerisation of virus factors involved in RNA replication is an essential step in the process [50], a conclusion that could be also verified in the poliovirus system [51]. More generally, the multimeric nature of complex viral systems, as the virus particles, has profound consequences in the apparent phenotype observed [52,53]. In the case of influenza, early data on the intragenic complementation of mutants affecting the PB1 and PA proteins suggested the potential role of virus polymerase interactions in the infectious cycle [54-56] and the recent biochemical evidence for virus polymerase oligomerisation supported such contention [57]. Here we have taken advantage of the availability of well-established recombinant systems for RNP replication and transcription and well-characterised polymerase mutants to address specific questions on the mechanisms of these processes. Due to the segmented nature of the influenza virus genome it is essential to use mutant polymerases having phenotypically distinct mutations in the same subunit, thus avoiding the problems of reassortment. Hence, we have used point mutants of polymerase PB2 subunit that abolish RNA replication but transcribe normally (R142A or F130A) [36] and/or mutants that are defective in cap-recognition and transcribe poorly, but replicate virus RNA normally (E361A among others) [20]. With these experimental tools we have asked whether the polymerase complex present in an RNP actually perform the replicative or transcriptional synthesis of RNA and whether the polymerase complex present in the progeny RNP is identical to that performing replicative synthesis of RNA. Our results will be discussed on the basis of the model presented in Fig. 8, in which only the replication step cRNP-to-vRNP is presented. The results shown in Figs. 1 and 2 indicated that two such phenotypically distinct mutant polymerases can complement to perform viral RNP replication *in vivo* and demonstrated that a replication-defective polymerase can be incorporated into progeny RNPs. These results are consistent with the model presented in Fig. 8A, step 4, that suggest that a polymerase complex distinct from that performing replicative synthesis is involved in the recognition of the 5'-end of the progeny vRNA. This model is also consistent with the results published earlier indicating that a pre-expressed polymerase can protect newly synthesised cRNA [13,38]. The identity of the replicative polymerase complex could be tested by directly transfecting mutant RNPs as templates for the replication reaction and asking whether co-expressed replication-defective or transcription-defective polymerase complexes could carry out the replication process *in trans*. The results shown in Figs. 3 and 4 demonstrated that a polymerase complex genetically distinguishable from that present in the parental RNP was able to perform replication and became incorporated into the progeny RNPs. These results are compatible with the model presented in Fig. 8A, steps 2-4, whereby a soluble polymerase complex would interact with that resident in the parental RNP and gain access to the 3'-terminal sequence in the promoter. Such polymerase-polymerase interaction is supported by the genetic data presented here, by the intragenic complementation reported earlier [54,55] and by the oligomerisation of influenza polymerase *in vivo* [57]. Although not shown in Fig. 8A, we can not exclude that a host factor(s) participate in the polymerase-polymerase interaction and in fact several nuclear factors have been described previously that could play such a role [25-30,32]. The trans-replication model depicted in Fig. 8A, steps 2-4 relates to the cRNP-to-vRNP phase in replication. However, earlier data published on the protection of newly synthesised cRNA by pre-expressed polymerase would suggest that the vRNP-to-cRNA phase can occur *in cis*, since a pre-expressed, catalytically inactive polymerase allowed the accumulation of cRNA in cycloheximide-treated, virus-infected cells [13].



According to the model proposed here, the soluble polymerase complex would act as replicative enzyme by de novo initiation and elongation through the NP-RNA template (Fig. 8, steps 3-4). We propose that the 3'-end of the parental RNA is used repetitively for further initiation rounds, thereby leading to several progeny vRNPs generated from a single cRNP template. For simplicity, the model presented in Fig. 8A does not show the interaction of the new incoming replicative complex with the parental polymerase bound to the 5'-end of the template, but such interaction might be required. In view of our previous evidence on polymerase-polymerase interaction [57], an appealing possibility is that the replicative polymerase complexes would oligomerise to form a fixed replication platform along which the NP-RNA template would move 3'-to-5' to generate many progeny vRNPs. Such strategy has a precedent in other positive-strand RNA viruses [44-47] and would be consistent with the localised synthesis of influenza virus RNA in the nucleus [58,59]. A critical point in the generation of progeny vRNP is the recognition and packaging of its newly synthesised 5'-end. Our results are compatible with the proposal that a polymerase complex distinct from the replicative enzyme can protect the newly synthesised vRNA (Fig. 8A, step 4) and this event probably represents the sequence-specific step in the encapsidation of RNA into progeny RNP. The subsequent incorporation of successive NP monomers would be directed by polymerase-NP interactions [60], that have been shown as essential for RNP replication [61,62], as well as by the NP-NP oligomerisation [17] (R. Coloma, unpublished results). Another critical point in the replication process is the displacement of the parental polymerase complex bound to the 5'-end of the template, a step necessary to avoid polyadenylation (see below) and to allow the complete copy of the RNA. Our results do not permit us to distinguish whether the elimination of such interaction is transient or permanent, but an attractive possibility would be that the reiterative copy of the NP-RNA template on a fixed platform of replicative polymerases would force the displacement of the parental polymerase bound to the 5'-terminal sequence. Such displacement could be transient, leading to the replacement of the parental polymerase by each successive replicative polymerase, or permanent, leading to a linearised NP-RNA complex (Fig. 8A, step n).

In contrast to the positive complementation obtained for the replication process, no trans-complementation could be detected in the transcription assays using either *in vitro* (Fig. 6) or *in vivo* experiments (Fig. 7). *In vitro* transcription of a recombinant RNP containing a cap-binding defective polymerase could not be rescued by a wt RNP holding a template of different length (Fig. 6). Similar negative results were obtained *in vivo*, by transfection of a cap-binding defective RNP and co-expression of wt or replication-defective but transcriptionally functional polymerase (Fig. 7). These results are not compatible with the possibility of transcription among viral RNPs *in trans* and do not support the possibility of a soluble polymerase transcribing an independent RNP. Furthermore, these results indicate a high stability of the polymerase binding to the RNP structure during the transcription process, as no polymerase exchange could be functionally detected. In view of the lack of detectable transcription *in trans*, we propose the model presented in Fig. 8B for the generation of viral mRNAs. The resident polymerase complex would be transcriptionally activated by recognition of the cap-containing cellular mRNA and proceed to cap-snatching and elongation of the virus transcript (Fig. 8B, step 2), but still keeping hold of the 5'-terminal sequence of the promoter [63]. Such process would lead to a running knot structure with a diminishing loop length (Fig. 8B, steps 2-4) until the transcribing polymerase reaches the oligo-U polyadenylation signal [10]. Due to steric hindrance, the polymerase would stutter around the oligo-U sequence and generate a 3'-terminal polyA (Fig. 8B, step 4). For simplicity, the model presented in Fig. 8B shows the transcribing RNP in a linearised form, but the polymerase complex should recognise the 3'-terminal side of the promoter at some time later in the process, in order to recycle and allow further rounds of transcription. This model for transcription of RNPs *in cis* is compatible with the fact that parental RNPs perform primary transcription as a first step in the infection and with the possibility to rescue virus by transfection of purified virion and/or recombinant RNPs [64,65]. It also would fit with the correlation of vRNA and mRNA levels of the various RNA segments along the infection cycle [66,67].

In summary, using genetically distinct RNA polymerase complexes, we have presented direct evidence for trans-complementation during the influenza virus RNA replication process. These results are compatible with a new model for viral RNA replication whereby a template RNP would be replicated in trans by a soluble polymerase complex and the progeny RNP encapsidation would be specified in trans by a polymerase complex distinct from the replicative enzyme. In contrast, no transcription in trans could be detected in vitro or in vivo and hence we propose a model for cis-transcription of the RNPs whereby the resident polymerase complex would be responsible for mRNA synthesis and polyadenylation.

## Materials and Methods

### *Biological materials*

The HEK293T cell line [68] was used throughout. The origins of plasmids pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPB2His, pCMVPA and pCMVNP, as well as pHHclone 23, have been described [20,64]. Plasmid pHHCAT was kindly provided by A. Rodriguez. The antibodies specific for PB2 and PA have been described [69,70]. Antibodies specific for NP were prepared by immunisation with purified His-NP protein. Mutant PB2 plasmids including mutations in the N-terminal region [36] or the cap-binding site [20] have been reported earlier. The mutations F130A, R142A, E361A, H357A, K370A and F404A were transferred to pCMVPB2 by swapping the appropriate restriction fragments. The genotype of the mutant plasmids was verified by sequencing.

### *Amplification and purification of recombinant RNPs*

Recombinant RNPs containing either the DNS clone 23 (248 nt) or the NSCAT (720 nt) genomic RNAs were generated and amplified in vivo by transfection of plasmids pCMVPB1, pCMVPB2His, pCMVPA, pCMVNP and either pHHclone23 or pHHNSCAT into HEK293T cells, using the calcium phosphate protocol [71]. For RNP purification, cell extracts were prepared at 24 hours post-transfection and incubated overnight at 4°C with 30 µl of Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose resin in a buffer containing 50 mM Tris-HCl-100 mM KCl-5mM MgCl<sub>2</sub>-0.5% Igepal-20 mM imidazol-1u/µl RNasin-EDTA-free protease inhibitors cocktail, pH 8. The resin was washed with 100 volumes of 50 mM Tris-HCl-100 mM KCl-5mM MgCl<sub>2</sub>-0.5% Igepal-20 mM imidazol, pH 8 and eluted with 50 mM Tris-HCl-100 mM KCl-0.5% Igepal-175 mM imidazol, pH 8. Under these conditions, binding of the progeny RNPs to the resin was quantitative, as using three-fold excess of Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose did not result in any increase in the yield of purified RNPs (see Fig. S5).

### *Biochemical techniques*

Western-blotting was performed as described [30]. The replication of RNPs in vivo was determined as described [20]. In brief, cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids pCMVPB1, pCMVPB2His (or mutants thereof) or pCMVPB2 (or mutants thereof), pCMVPA, pCMVNP and pHHclone 23. In some experiments pHHclone 23 plasmid was omitted and purified clone 23 RNPs were transfected instead, 24 hours after plasmid transfection. Total cell extracts were prepared at 24 hours post-transfection and used for purification by affinity chromatography on Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose as indicated above and the accumulation of progeny RNPs was determined by Western-blot with anti-NP-specific antibodies. The transcription of RNPs in vivo was assayed by transfection of purified NSCAT RNPs into HEK293T cells. The cultures were first transfected with plasmids pCMVPB1, pCMVPB2 (or mutants thereof) and pCMVPA [20] and 24 hours later



were further transfected with purified His-tagged NSCAT RNPs under the same conditions. At 24 hours post RNP-transfection, total cell extracts were prepared and the CAT protein concentration was determined by ELISA (GE Healthcare).

### *RNA analyses*

To determine the transcription activity of purified RNPs, samples were incubated in a buffer containing 50 mM Tris-HCl-5 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM KCl-1mM DTT-10 µg/ml actinomycin D-1u/µl RNA-sin-1mM ATP-1 mM CTP-1 mM UTP-10 µM α-P<sup>32</sup>-GTP (20 µCi/µmol) and either 100 µM ApG or 10 µg/ml b-globin mRNA, for 60 min at 30 °C. The RNA synthesised was TCA precipitated, filtered through a nylon filter in a dot-blot apparatus and quantified in a phosphorimager. To analyse the transcription products, similar reactions were carried out but the specific activity of the labelled GTP was increased to 200 µCi/µmol. The synthesised RNA was isolated by treatment with proteinase K (50 µg/ml) for 30 min at 37°C in TNE-1% SdS and phenol extraction. The RNA was ethanol precipitated, resuspended in formamide loading buffer and analysed by electrophoresis in a 4% polyacrylamide-urea denaturing gel.

To analyse the progeny RNA, purified RNPs were incubated with proteinase K (200 µg/ml) in a buffer containing 100 mM NaCl-5 mM EDTA-0.5% SDS-50 mM Tris.HCl, pH 7.5 for 60 min at 37 °C, phenol extracted with ethanol precipitated. Samples of the purified RNAs were denatured by boiling for 3 min in 7.5% formaldehyde-10SSC and were fixed onto nylon filters. Replicate filters were hybridised at 37°C with full-length NS riboprobes of either positive- or negative-polarity in a buffer containing 6SSC-40% formamide-0.5% SDS-5xDenhart's mixture-100 µg/ml single-stranded DNA. After washing at 60°C with 0.1SSC-0.1%SDS, hybridisation signals were quantitated in a phosphorimager.

### **Acknowledgments**

We thank J.A. Garcia, J.A. Melero and A. Nieto for critically reading this manuscript. We are indebted to all members of the groups of A. Nieto and J. Ortín for their suggestions. We thank A. Rodriguez for providing the pHHCAT plasmid. The technical assistance of Yolanda Fernández, Noelia Zamarreño and Marcela Benavides is gratefully acknowledged.

## References

1. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y (2007) Orthomyxoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1691-1740.
2. Horimoto T, Kawaoka Y (2005) Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3: 591-600.
3. Palese P, Shaw M (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1647-1689.
4. González S, Zürcher T, Ortín J (1996) Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein responsible for interaction with the PB2 and PA subunits: A model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res* 24: 4456-4463.
5. Lee MT, Klumpp K, Digard P, Tiley L (2003) Activation of influenza virus RNA polymerase by the 5' and 3' terminal duplex of genomic RNA. *Nucleic Acids Res* 31: 1624-1632.
6. Tiley LS, Hagen M, Mathews JT, Krystal M (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J Virol* 68: 5108-5116.
7. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* 16: 1248-1257.
8. Krug RM, Broni BA, Bouloy M (1979) Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* 18: 329-334.
9. Poon LLM, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG (1999) Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* 73: 3473-3476.
10. Robertson JS, Schubert M, Lazzarini RA (1981) Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* 38: 157-163.
11. Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, Skehel JJ (1977) Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 83: 337-355.
12. Elton D, Digard P, Tiley L, Ortín J (2005) Structure and function of the influenza virus RNP. In: Kawaoka Y, editor. *Current Topics in Influenza Virology*. Norfolk: Horizon Scientific Press. pp. 1-92.
13. Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* 78: 9568-9572.
14. Martín-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, et al. (2001) Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports* 2: 313-317.
15. Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, et al. (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 74: 156-163.
16. Ng AK, Zhang H, Tan K, Li Z, Liu JH, et al. (2008) Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *Faseb J* 22: 3638-3647.
17. Ye Q, Krug RM, Tao YJ (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* 444: 1078-1082.
18. Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, et al. (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 308-313.
19. Torreira E, Schoehn G, Fernández Y, Jorba N, Ruigrok RW, et al. (2007) Three-dimensional model for the isolated influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 35: 3774-3783.
20. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, et al. (2008) The structural basis for cap-binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 500-

21. He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, et al. (2008) Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 454: 1123-1126.
22. Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, et al. (2008) The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454: 1127-1131.
23. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, et al. (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 14: 229-233.
24. Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, et al. (2008) Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* 4: e1000136.
25. Kawaguchi A, Nagata K (2007) De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J* 26: 4566-4575.
26. Momose F, Handa H, Nagata K (1996) Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* 78: 1103-1108.
27. Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, et al. (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277: 45306-45314.
28. Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, et al. (2007) An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18235-18240.
29. Mayer D, Molawi K, Martinez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, et al. (2007) Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. *J Proteome Res* 6: 672-682.
30. Jorba N, Juarez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamarreño N, et al. (2008) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8: 2077-2088.
31. Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchiev AV, Brownlee GG, et al. (2006) The role of Ran Binding Protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* 80: 11911-11919.
32. Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortín J, Nieto A (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* 75: 8597-8604.
33. Gabriel G, Herwig A, Klenk HD (2008) Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin alpha1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* 4: e11.
34. Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreño N, Fernández Y, Juarez S, et al. (2008) The host-dependent interaction of  $\alpha$ -importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* 3: in press.
35. Mena I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, et al. (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* 75: 2109-2114.
36. Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* 76: 5098-5108.
37. Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortín J, et al. (1999) Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* 73: 1186-1194.
38. Vreede FT, Brownlee GG (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* 81: 2196-2204.
39. Lamb RA, Choppin PW (1976) Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology* 74: 504-519.

40. Scholtissek C, Rott R (1970) Synthesis in vivo of influenza virus plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* 40: 989-996.
41. de la Luna S, Martín J, Portela A, Ortín J (1993) Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J Gen Virol* 74: 535-539.
42. Huang TS, Palese P, Krystal M (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* 64: 5669-5673.
43. Ortín J, Parra F (2006) Structure and Function of RNA Replication. *Annu Rev Microbiol* 60: 305-326.
44. Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, et al. (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *Embo J* 20: 1153-1163.
45. Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* 296: 2218-2222.
46. Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, et al. (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 277: 2132-2137.
47. Wang QM, Hockman MA, Staschke K, Johnson RB, Case KA, et al. (2002) Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 76: 3865-3872.
48. Cevik B, Smallwood S, Moyer SA (2003) The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. *Virology* 313: 525-536.
49. Smallwood S, Cevik B, Moyer SA (2002) Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the sendai virus RNA polymerase. *Virology* 304: 235-245.
50. Youngner JS, Frielle DW, Whitaker-Dowling P (1986) Dominance of temperature-sensitive phenotypes. I. Studies of the mechanism of inhibition of the growth of wild-type vesicular stomatitis virus. *Virology* 155: 225-235.
51. Crowder S, Kirkegaard K (2005) Trans-dominant inhibition of RNA viral replication can slow growth of drug-resistant viruses. *Nat Genet* 37: 701-709.
52. Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA, Clarke D, Duarte E, et al. (1989) Virus mutation frequencies can be greatly underestimated by monoclonal antibody neutralization of virions. *J Virol* 63: 5030-5036.
53. Valcarcel J, Ortín J (1989) Phenotypic hiding: the carryover of mutations in RNA viruses as shown by detection of mar mutants in influenza virus. *J Virol* 63: 4107-4109.
54. Massicot JG, Van Wyke K, Chanock RM, Murphy BR (1982) Evidence for intrasegmental complementation between two influenza A viruses having ts mutations on their P1 genes. *Virology* 117: 496-500.
55. Heller E, Scholtissek C (1980) Evidence for intracistronic complementation of the product of the influenza virus gene Ptra (P3 of fowl plague virus). *J Gen Virol* 49: 133-139.
56. Mahy BWJ (1983) Mutants of influenza virus. In: Palese P, Kingsbury DW, editors. *Genetics of influenza viruses*. Wien: Springer Verlag. pp. 192-253.
57. Jorba N, Area E, Ortín J (2008) Oligomerisation of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol* 89: 520-524.
58. Jackson DA, Caton AJ, McCready SJ, Cook PR (1982) Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* 296: 366-368.
59. López-Turiso JA, Martínez C, Tanaka T, Ortín J (1990) The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* 16: 325-337.
60. Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* 72: 5493-5501.
61. Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S, Naffakh N (2007) Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* 362: 271-282.
62. Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P (2004) Functional domains of the influenza A virus PB2

- protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* 321: 120-133.
63. Pritlove DC, Poon LLM, Devenish LJ, Mike B. Leahy MB, Brownlee GG (1999) A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J Virol* 73: 2109-2114.
  64. Falcón AM, Marión RM, Zürcher T, Gómez P, Portela A, et al. (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J Virol* 78: 3880-3888.
  65. Rochovansky OM, Hirst GK (1976) Infectivity and marker rescue activity of influenza virus ribonucleoprotein-polymerase complexes. *Virology* 73: 339-349.
  66. Shapiro GI, Gurney TJ, Krug RM (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* 61: 764-773.
  67. Smith GL, Hay AJ (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology* 118: 96-108.
  68. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, et al. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-387.
  69. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, et al. (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* 68: 6900-6909.
  70. Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, et al. (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* 37: 305-315.
  71. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, et al. (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1373-1376.

## Figure legends

### Figure 1. Intracistronic polymerase complementation during influenza virus RNA replication.

(A ) Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing a virus-like replicon of 248 nt, the NP and various combinations of the polymerase subunits as indicated in the diagram. The potential RNPs that could be generated are also depicted in the diagram, as well as the expected progeny RNPs, depending on the replication phenotype of the polymerase mutants used.

(B) The progeny RNPs were purified from total cell extracts over Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose resin and analysed by Western-blot with anti-NP antibodies. The top panel presents the accumulation of NP in the total cell extract whereas the bottom panel shows the NP accumulation of purified RNPs. The integrity of the purified RNPs is verified by Western-blot using anti-PB2 and anti-PA antibodies. In the bottom graph the average NP accumulation and standard deviation of three independent complementation experiments are presented as percent of maximal value.

### Figure 2. Phenotype of trans-complemented RNPs.

The purified RNP preparations presented in Fig. 1 were tested for in vitro transcription primed with either ApG (red) or b-globin mRNA (green). The data are presented as percent of maximal value and represent the averages and ranges of two independent complementation experiments. The transcription activities parallel the values of NP accumulation presented in Fig. 1 and show that the rescued RNPs have a wt cap-snatching phenotype.

### Figure 3. Replication of RNPs by a soluble polymerase complex in trans.

(A) Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing the NP and various combinations of the polymerase subunits as indicated in the diagram. In some cases, purified RNPs containing replication-deficient or transcription-deficient polymerase were also transfected. The expected progeny RNPs are also depicted, depending on the replication phenotype of the polymerase mutants used.

(B) Left panel. The amount of replication-deficient (R142) or transcription deficient (R361) RNPs transfected was ascertained by Western-blot with anti-NP and anti-PB2 antibodies. The mobility of molecular weight markers is shown to the left and the position of PB2 and NP proteins is indicated to the right. Right panel. The transcription phenotype of the RNPs transfected was determined by in vitro transcription using ApG (ApG) or b-globin mRNA (b-glob) as primers. The panel shows the phosphorimager data.

(C) The progeny RNPs were purified from total cell extracts over  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-agarose resin and analysed by Western-blot with anti-NP antibodies. The top panel presents the accumulation of NP in the total cell extract whereas the bottom panel shows the NP accumulation of purified RNPs. The integrity of the RNPs is verified by Western-blot using anti-PB2 and anti-PA antibodies. In the bottom graph the average NP accumulation and range of two independent complementation experiments are presented as percent of maximal value. The transfecting RNPs are denoted as RNP142 or RNP361. The genotypes of the transfected polymerases are indicated as Pol142 or Pol361. CMV indicates the transfection of empty pCMV plasmid.

### Figure 4. Analysis of the genomic RNA present in purified RNPs

Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing the NP and various combinations of the polymerase subunits and purified RNPs containing either replication-deficient or transcription-deficient polymerase, as indicated in the diagram of Fig. 3A. The purified progeny RNPs were purified from total cell extracts by affinity chromatography over  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-agarose and the RNA present in the purified RNPs was extracted as described under Materials and Methods.

(A) Hybridisation controls. Dilutions of plasmid pHHDNS clone 23, containing the sequence of the RNP replicons used (+), or total yeast RNA (-) were applied onto a nylon filter as hybridisation controls (from  $10^3$  to  $10^0$  ng, as indicated at the top of the figure). Hybridisation was performed using a positive-polarity or a negative-polarity probe comprising the full-length insert present in pHHDNS clone 23, thereby detecting either vRNA or cRNA, respectively.

(B) Aliquots of the RNA present in purified RNPs obtained from cultures transfected with the mixtures indicated at the bottom of the figure were hybridised in parallel to the hybridisation controls shown in (A) and the hybridisation signals were quantitated in a phosphorimager, using the signals in (A) to standardise the relative hybridisation efficiency of the positive- and negative-polarity probes. The results for vRNA (blue) and cRNA (orange) are presented as percent of the maximal signal and represent the averages and standard deviations of 4 quantisations.

### Figure 5. Phenotype of trans-complemented RNPs.

The purified RNP preparations presented in Fig. 3 were tested for in vitro transcription primed with either ApG (red) or b-globin mRNA (green). The data are presented as percent of maximal

value and represent the averages and range of two independent complementation experiments. The transfecting RNPs are denoted as RNP142 or RNP361. The genotypes of the transfected polymerases are indicated as Pol142 or Pol361. CMV indicates the transfection of empty pCMV plasmid. The transcription activities parallel the values of NP accumulation presented in Fig. 3 and show that the rescued RNPs have a cap-snatching defective phenotype.

**Figure 6. Genetically distinct RNPs cannot transcribe reciprocally in vitro.**

(A) Recombinant RNPs were generated by in vivo amplification as described in Materials and Methods and the legend to Fig. 1, using either wt (WT) or transcription-defective (E361A) polymerase. Short (clone 23 -248 nt-), long (CAT -720 nt-) or no (CTRL) RNA replicons were used. The RNPs were purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose chromatography and their transcription activity was determined. Top panel shows the phosphorimager data and bottom panel presents the quantitation, indicating the cap-snatching defective phenotype of RNPs containing the E361A mutation in PB2.

(B) Purified wt (WT CAT) or E361A mutant RNPs (361 CAT) containing the *cat* gene were transcribed in vitro, using b-globin mRNA as primer, either alone or in a mixture with wt clone 23 RNPs (cl23). The transcription products were purified and analysed by polyacrylamide-urea denaturing gel electrophoresis. The mobility of molecular weight markers is shown to the left and the position of *cat* and clone 23 transcripts is indicated to the right.

**Figure 7. Lack of transcription of RNPs by a soluble polymerase complex in trans.**

(A) Cultures of HEK293T cells were transfected with plasmids expressing various combinations of the polymerase subunits as indicated in the diagram. In some cases, purified *cat* RNPs containing wt or transcription-deficient polymerase were also transfected.

(B) Left panel. The amount of wt (wt) or transcription deficient (361) RNPs transfected was ascertained by Western-blot with anti-NP and anti-PA antibodies. The mobility of molecular weight markers is shown to the left and the position of PA and NP proteins is indicated to the right. Right panel. The transcription phenotype of the RNPs transfected was determined by in vitro transcription using ApG (ApG) or b-globin mRNA (b-globin) as primers. The panel shows the phosphorimager data.

(C) The amount of CAT protein accumulated in the cells was determined by ELISA. The data are presented as percent of the value obtained by transfection of purified wt RNPs and represent the average and standard deviation of six independent experiments. The 100% value represented corresponds to a concentration of 340 pg/ml of CAT protein.

**Figure 8. A model for influenza RNP replication and transcription.**

(A) Various steps in the process of RNP replication. The coloured NP indicates the polarity of the templates (brown: positive polarity; green: negative polarity). The parental polymerase complex is denoted by solid colours while the semi-transparent colouring indicates a newly synthesised complex. See text for details.



(B) Various steps in the process of RNP transcription. The capped primer is depicted as a thick line with a red circle. See text for details.

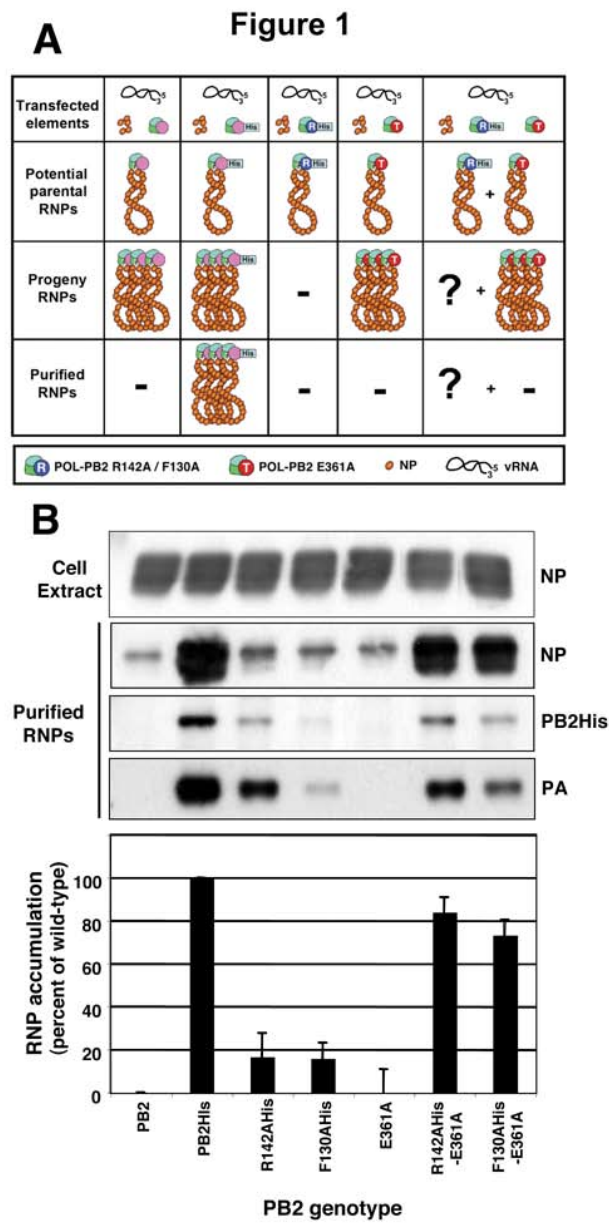


Figure 2

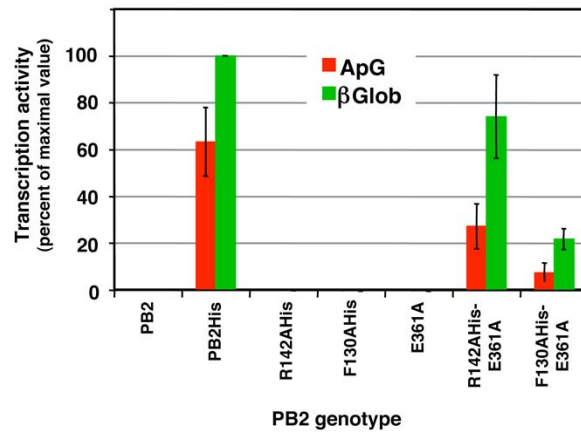


Figure 3

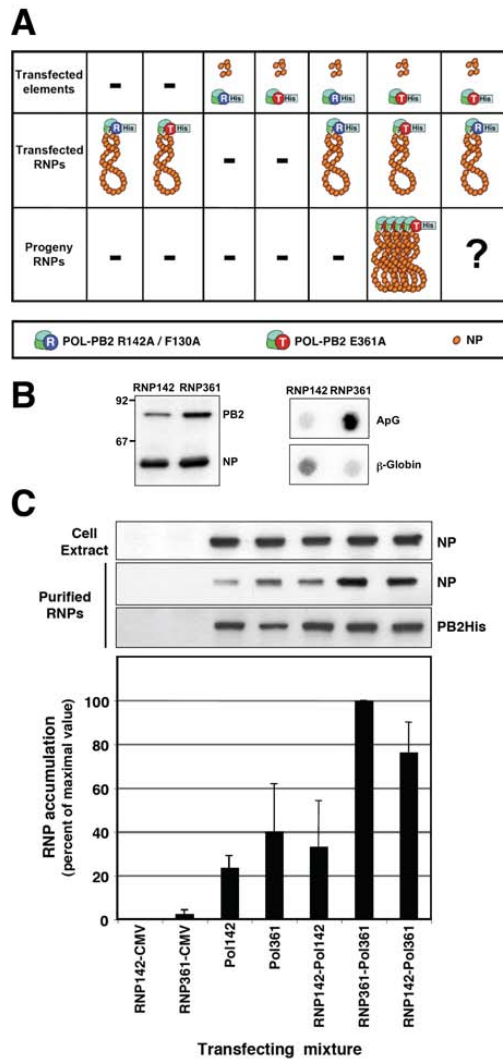


Figure 4

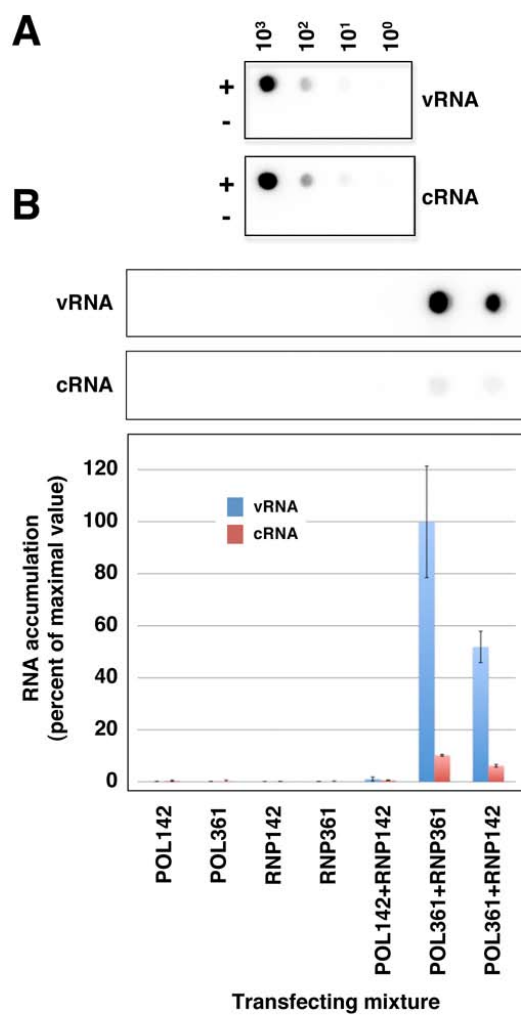
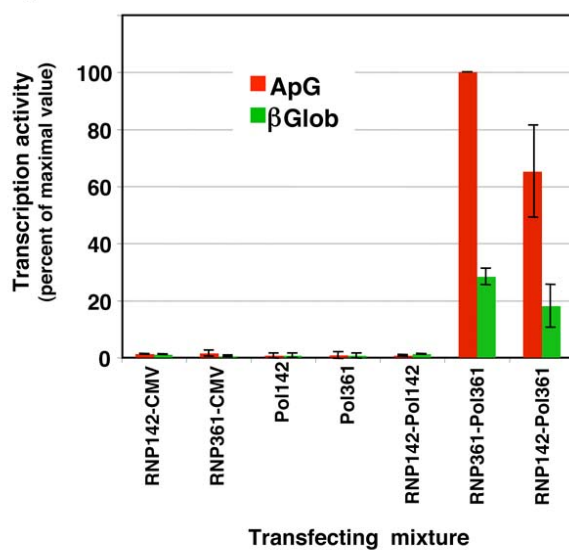
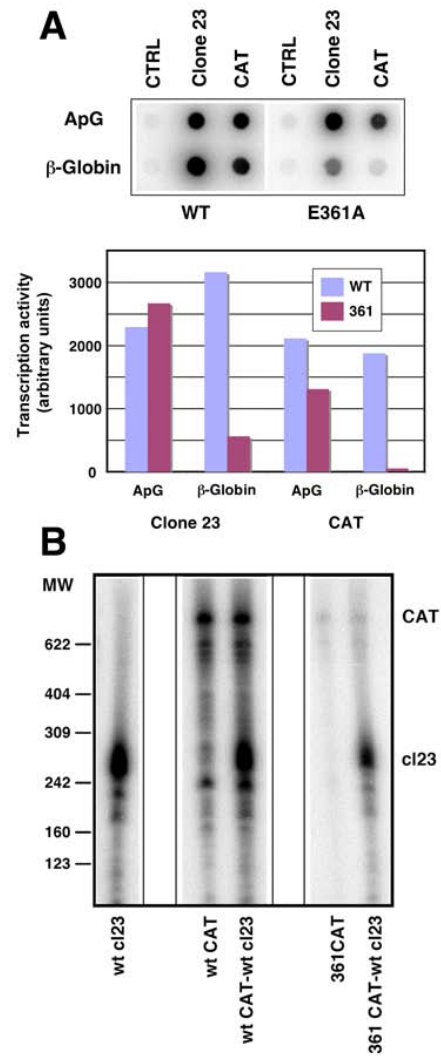


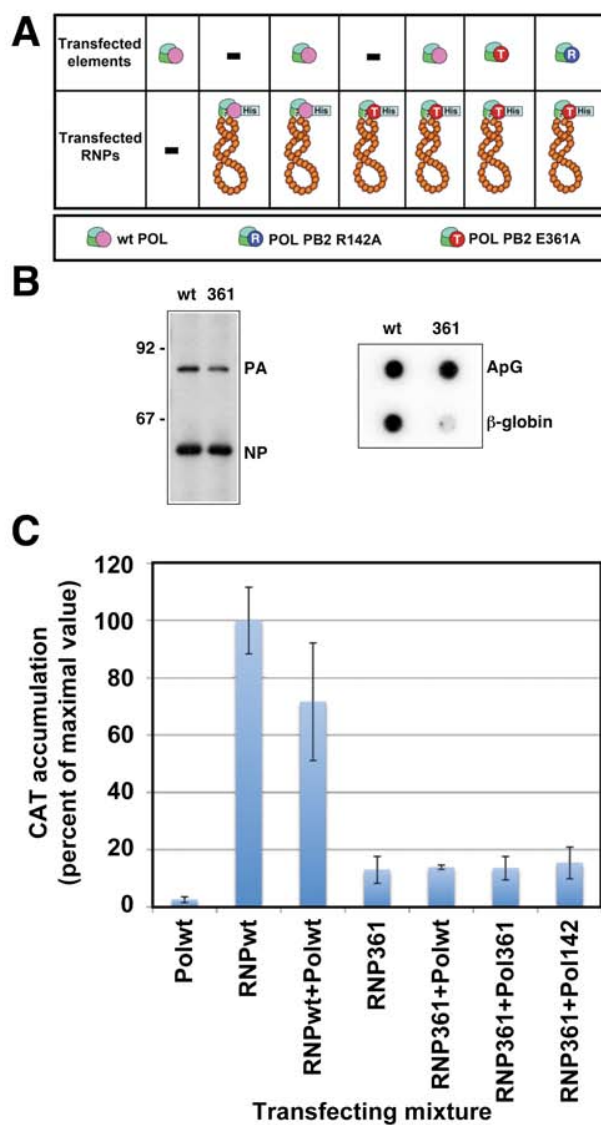
Figure 5



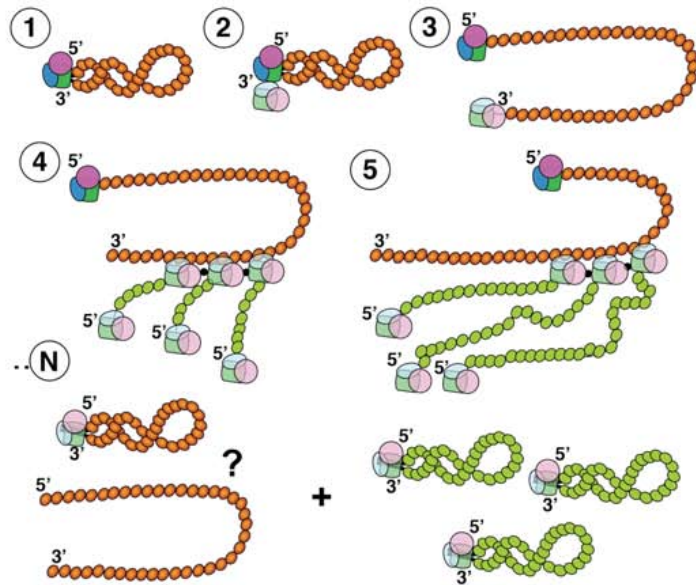
**Figure 6**



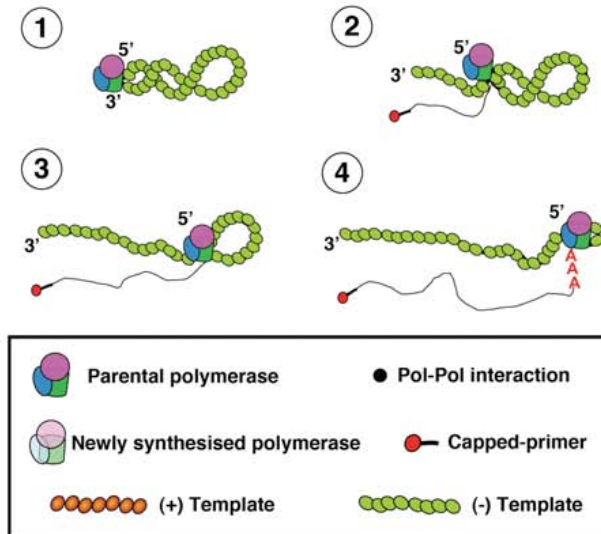
**Figure 7**



# **A**      **REPLICATION**      **Figure 8**



## **B**      **TRANSCRIPTION**



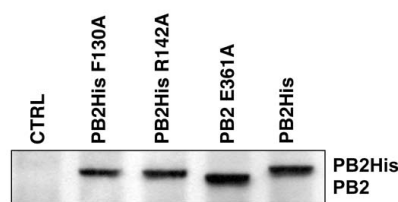


Figure S1

Figure S2

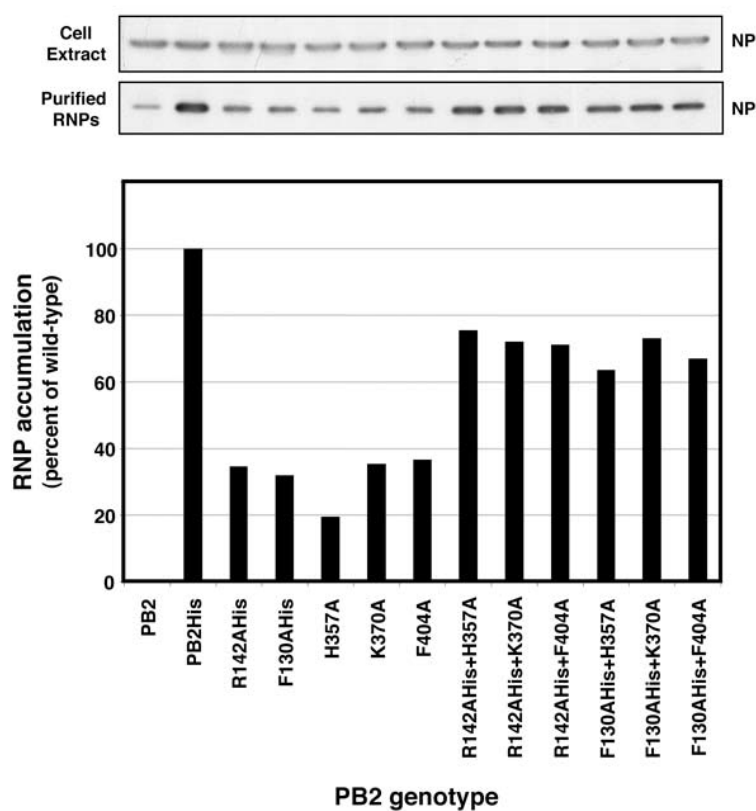




Figure S3

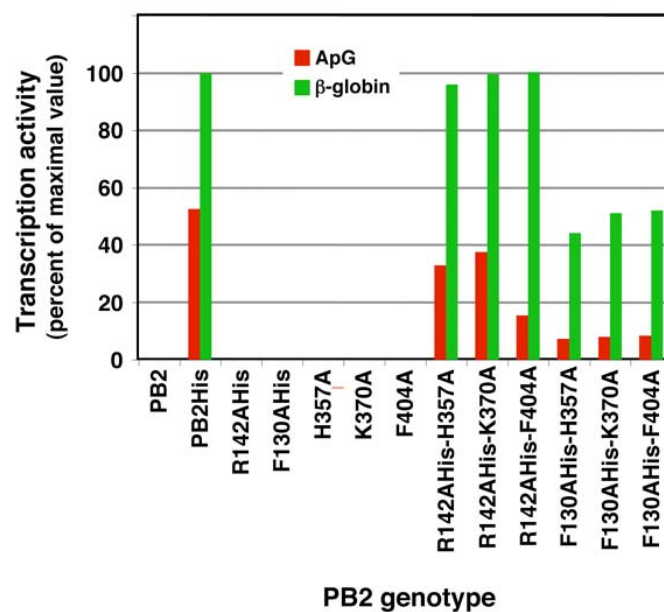


Figure S4

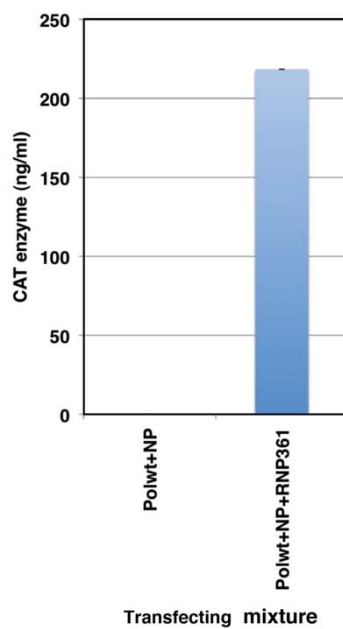


Figure S5

